



Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur de

**L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR - STRASBOURG I**

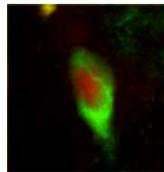
Faculté des Sciences de la Vie

Ecole doctorale Vie et Santé

Doctorat en  
Neurosciences

**Oliva Erendira LUIS DELGADO**

**Etude de l'induction de  $\Delta$ FosB dans la moelle épinière lors d'une stimulation nociceptive de type inflammatoire et de ses relations avec nNOS**



Thèse dirigée par le Pr. François LASBENNES

Soutenue à Strasbourg le 5 mai 2006

Devant le jury composé de:

**Pr. François LASBENNES**

**Pr. Jean ZWILLER**

**Pr. Marc LANDRY**

**Dr. Luis VILLANUEVA**

**Dr. Miguel CONDES-LARA**

directeur de thèse

rapporteur interne

rapporteur externe

rapporteur externe

examinateur

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été effectués dans l'**Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives UMR 7168/LC2 - CNRS/ULP Département Nociception et Douleur** faisant partie de l'**IFR des Neurosciences de Strasbourg**.

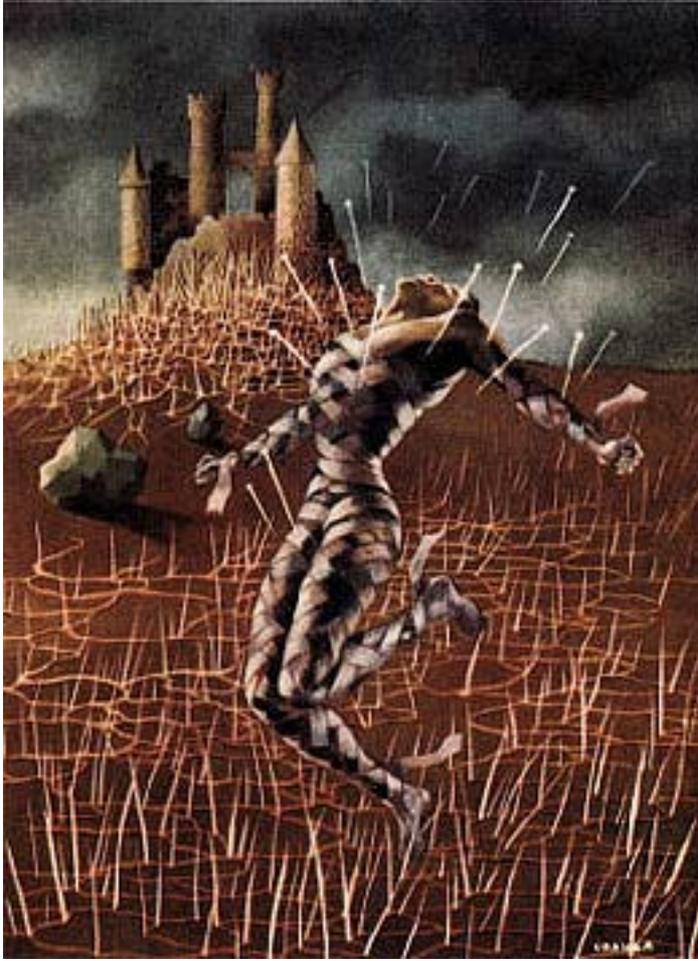
Certains d'entre eux sont le résultat d'une collaboration active de la part de nombreuses personnes au sein du laboratoire: **Michel Barrot, Malika Benbouzid, Claudia Castillo, Christine Patte-Mensah, Pierrick Poisbeau, Grégory Schott, Raymonde Syllas** et **Elisabeth Waltisperger**. Les analyses statistiques ont été réalisées par **Jean-Luc Rodeau**.

J'ai bénéficié aussi des conseils et de l'expertise de **Marie-José Freund-Mercier, Jean-Marie Gachon, Cédric Mathieu, Maysa Sarhan, Rémy Schlichter, Elizabeth Stockel, Eriko Terao** et **Sandra Uhl-Bronner**, ainsi que du bon accueil et de l'encouragement de tous les membres de l'Unité.

Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier du «**Programa de Mejoramiento del Profesorado**» du **Ministère de l'Éducation Publique du Mexique**, de **L'Université Autonome de Zacatecas (Promep/UZAC-185)**, et du programme **Ecos-Nord**.

Je voudrais remercier les **membres du Jury** pour avoir investi aimablement son temps dans l'évaluation de ce travail.

Que tous ceux qui m'ont permis de réaliser ce travail soient ici chaleureusement remerciés, spécialement le Pr. **François Lasbennes** et le Dr. **Miguel Condés Lara**.



**“Dolor reumático II”**

*Remedios Varo (1948)*

*Si tu ne veux pas tomber en proie à la douleur,*

*Marche à sa rencontre.*

*Lanza del Vasto*

*Principes et préceptes*

## TABLE DES MATIERES

<b>Table des matières</b>	i
<b>Table des illustrations</b>	ii
<b>Abréviations</b>	iii
<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>10</b>
<b>1. LA DOULEUR</b> .....	12
1.1 Généralités.....	12
1.1.1 Historique.....	12
1.1.2 Théories de la douleur.....	13
1.1.3 Définition de la douleur.....	15
1.1.4 Classification et évaluation de la douleur.....	16
1.1.5 Traitement de la douleur.....	18
1.1.5.1 Traitements médicamenteux.....	18
1.1.5.2 Les moyens invasifs pour soulager la douleur.....	19
1.1.5.2.1 les neurolyses.....	19
1.1.5.2.2 la neurochirurgie.....	19
1.2 Bases anatomiques et physiologiques de la nociception.....	20
1.2.1 Récepteurs sensoriels.....	21
1.2.2 Voies nociceptives.....	22
1.2.3 Mécanismes de contrôle de la nociception.....	27
1.3 Moelle épinière.....	29
1.4 La douleur chez l'animal.....	31
<b>2. INFLAMMATION ET DOULEUR</b> .....	35
2.1 Réaction inflammatoire.....	35
2.2 Médiateurs de l'inflammation.....	36
2.3 Etude expérimentale de la douleur inflammatoire: le modèle carragénine.....	38
<b>3. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION DE LA FAMILLE FOS</b> .....	40
3.1 Le facteur de transcription c-Fos.....	40
3.2 Les facteurs de transcription FosB et $\Delta$ FosB.....	42
3.3 Plasticité neuronale et douleur.....	43
<b>4. OXYDE NITRIQUE, INFLAMMATION ET DOULEUR</b> .....	44
4.1 Les enzymes de synthèse de NO.....	45
4.2 Action générale de NO dans le système nerveux.....	46
4.3 Les NOS dans la moelle épinière.....	47
4.4 L'oxyde nitrique et la douleur.....	48
<b>5. OBJECTIFS</b> .....	50

## **II. MATERIEL ET METHODES** **51**

<b>1. ANIMAUX</b> .....	51
<b>2. TRAITEMENTS</b> .....	51
2.1 Injection intraplantaire de zymosan.....	51
2.2 Injection intraplantaire de carragénine.....	52
2.3 Injection sous-cutanée de morphine.....	52
<b>3. MESURE DU VOLUME DE L'OEDEME</b> .....	52
<b>4. TESTS COMPORTEMENTAUX</b> .....	53
4.1 Test de Randall et Selitto.....	53
4.2 Test de la pince calibrée.....	53
4.3 Filaments de von Frey.....	54
4.4 « Plantar test ».....	54
<b>5. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES</b> .....	55
5.1 Perfusion des animaux et réalisation des coupes histologiques.....	55
5.2 Histologie: coloration au violet de crésyl.....	56
5.3 Immunohistologie.....	56
5.3.1 Immunoperoxydase.....	56
5.3.2 Immunofluorescence.....	57
5.4 Quantification de cellules immunopositives pour FosB et $\Delta$ FosB.....	59
<b>6. MESURE DE L'ACTIVITE DE LA MYELOPEROXYDASE</b> .....	59
<b>7. ANALYSE STATISTIQUE</b> .....	60
<b>8. PROTOCOLES EXPERIMENTAUX</b> .....	61
8.1 Caractérisation et validation de la pince Bioseb.....	61
8.2 Etude du modèle carragénine.....	61
8.2.1 Caractérisation de l'inflammation.....	61
8.2.2 Test de seuil de sensibilité.....	62
8.2.3 Facteurs de transcription.....	62
8.3 Immunohistologie de nNOS et douleur inflammatoire.....	62
8.3.1 Répartition de nNOS dans la moelle épinière chez les rats naïfs.....	62
8.3.2 Répartition de nNOS dans le modèle inflammatoire.....	62
8.3.2.1 Modèle zymosan.....	62
8.3.2.2 Modèle carragénine.....	63

## **III. RESULTATS** **64**

<b>1. CARACTERISATION ET VALIDATION DE LA PINCE BIOSEB CHEZ LES ANIMAUX NAIFS</b> .....	64
1.1 Caractérisation.....	64
1.2 Validation.....	65
1.2.1 Reproductibilité entre investigateurs.....	65
1.2.2 Application de la pince Bioseb: étude des effets analgésiques de la morphine.....	65
<b>2. MODELE CARRAGENINE, MODELE DE DOULEUR SOUTENUE</b> .....	66
2.1 Caractérisation de l'inflammation.....	66
2.2 Seuil nociceptif dans le modèle carragénine.....	67
2.2.1 Test de la pince calibrée Bioseb.....	67
2.2.2 Test des filaments de von Frey.....	67
2.2.3 «Plantar Test».....	68

2.3 Facteurs de transcription: expression et immunocytochimie des protéines FosB.....	68
2.3.1 Répartition de FosB-LI dans la moelle épinière.....	68
<b>3. nNOS ET DOULEUR INFLAMMATOIRE.....</b>	<b>71</b>
3.1 Répartition de nNOS dans la moelle épinière chez les rats naïfs.....	71
3.2 nNOS dans le modèle inflammatoire.....	71
3.2.1 nNOS simple marquage.....	71
3.2.2 nNOS double marquage.....	72
3.2.2.1 nNOS/GLUT-1.....	72
3.2.2.2 Marquages nNOS et famille Fos.....	72
<b>IV. DISCUSSION</b>	<b>74</b>
<b>1. PINCE CALIBREE BIOSEB.....</b>	<b>74</b>
1.1 Caractéristiques du test nociceptif mécanique.....	74
1.2 Comparaison avec les autres test mécaniques classiques.....	76
1.3 L'utilisation de la pince calibrée révèle les effets analgésiques de la morphine.....	78
<b>2. MODELE CARRAGENINE, UN MODELE DE DOULEUR SOUTENUE.....</b>	<b>80</b>
2.1 L'œdème.....	80
2.2 Hyperalgésie mécanique et thermique.....	81
<b>3. PLASTICITE NEURONALE ET FACTEURS DE TRANSCRIPTION FOS DANS LA MOELLE EPINIÈRE.....</b>	<b>82</b>
<b>4. nNOS.....</b>	<b>87</b>
4.1 Répartition de nNOS dans la moelle épinière chez le rat.....	87
4.2 nNOS et modèle de douleur inflammatoire.....	89
4.3 nNOS et facteurs de transcription.....	90
<b>V. PERSPECTIVES</b>	<b>93</b>
<b>VI. ANNEXES</b>	<b>94</b>
<b>1. SOLUTIONS.....</b>	<b>94</b>
<b>2. TABLEAUX DE COMPTAGE DE CELLULES FOSB-LI DANS LES CORNES DORSALES DE LA MOELLE EPINIÈRE.....</b>	<b>96</b>
<b>3. GRAPHIQUES DU NOMBRE DE CELLULES FOSB-LI DANS LES CORNES DORSALES DE LA MOELLE EPINIÈRE.....</b>	<b>104</b>
<b>4. GLOSSAIRE.....</b>	<b>115</b>
<b>VII. BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>119</b>
<b>VIII. COMMUNICATIONS</b>	<b>142</b>

## Table des illustrations

<b>Fig. I-1:</b> La sensation douloureuse d'après Descartes .....	
<b>Fig. I-2A:</b> Schéma de la théorie de la douleur d'après von Frey .....	
<b>Fig. I-2B:</b> Schéma de la théorie de la douleur d' Alfred Goldscheider .....	
<b>Fig. I-2C:</b> Schéma du modèle de la réverbération de circuits .....	
<b>Fig. I-2D:</b> Schéma de la théorie de l'interaction sensoriel .....	
<b>Fig. I-3:</b> Dessin de la théorie du portillon de Melzack et Wall .....	
<b>Tableau I-1:</b> Paliers pour soulager la douleur d'après l'OMS .....	
<b>Tableau I-2:</b> Catégories de fibres selon les classifications Loyd pour le nerf musculaire; Erlanger pour le nerf cutané .....	
<b>Fig. I-4:</b> Schéma du système des cordons postérieurs et du système latéral .....	
<b>Fig. I-5:</b> Schéma du système antérolatéral de la transmission nociceptive .....	
<b>Fig. I-6:</b> Schéma du système médian .....	
<b>Fig. I-7:</b> Schéma des systèmes descendants endogènes de la modulation de la douleur .....	
<b>Fig. I-8A:</b> Schéma de coupe de moelle épinière au niveau lombaire3 et couches de Rexed .....	
<b>Fig. I-8B:</b> Coupe de moelle épinière au niveau lombaire3 colorée au crésyl violet .....	
<b>Fig. I-9:</b> Projection des fibres A $\beta$ , A $\delta$ et C dans la moelle épinière .....	
<b>Fig. I-10A:</b> Projections des afférences cutanées dans la moelle épinière .....	
<b>Fig. I-10B:</b> Somatotopie des afférentes primaires de la patte du rat dans la moelle épinière .....	
<b>Fig. I-11A:</b> Dermatomes du membre inférieur du rat .....	
<b>Fig. I-11B:</b> Dermatomes nociceptifs de la patte du rat .....	
<b>Tableau I-3:</b> Méthodes utilisées pour évaluer la douleur chez l'animal .....	
<b>Fig. I-12:</b> Schéma de la «soupe inflammatoire» .....	
<b>Fig. I-13:</b> Photo de l'algue <i>Chondrus crispus</i> (carragénine) .....	
<b>Fig. I-14A:</b> Schéma de la protéine FosB .....	
<b>Fig. I-14B:</b> Schéma de l'expression des protéines de la famille Fos au cours du temps .....	
<b>Fig. I-15:</b> Schéma indiquant la production de NO .....	
<b>Tableau I-4:</b> Nitrique oxyde synthétases .....	
<b>Fig. M-1-:</b> Injection intraplantaire .....	
<b>Fig. M-17A:</b> Analgesimètre (Test de Randall et Selitto) .....	
<b>Fig. M-17B:</b> Application du test de Randall et Selitto .....	
<b>Fig. M-18A:</b> Pince Bioseb .....	
<b>Fig. M-18B:</b> Dynamomètre électronique .....	
<b>Fig. M-19:</b> Test de la pince calibrée .....	
<b>Fig. M-20A:</b> Filaments de von Frey .....	
<b>Fig. M-20B:</b> "Plantar Tes"t .....	

<b>Fig. M-21A:</b> Photo de la moelle épinière montrant le niveau lombaire .....	
<b>Fig. M-21B:</b> Schéma de la région de contage de Fos-LI dans la moelle épinière .....	
<b>Fig. R-22A:</b> Graphique du Test de la pince calibrée au cours de neuf jours .....	
<b>Fig. R-22B:</b> Graphique du prise de poids au cours du temps .....	
<b>Fig. R-23A:</b> Graphique du test de la pince calibrée pendant deux heures .....	
<b>Fig. R-23B:</b> Graphique de reproductibilité du test de la pince calibrée entre deux investigateurs différents .....	
<b>Fig. R-24A:</b> Graphique de l'effet de la dose de morphine sur le seuil mécanique .....	
<b>Fig. R-24B:</b> Graphique de la tolérance à la morphine sur le seuil mécanique .....	
<b>Fig. R-25A:</b> Graphique du volume de l'œdème dans la phase précoce du modèle carragénine .....	
<b>Fig. R-25B:</b> Graphique du volume de l'œdème dans la phase tardive du modèle carragénine .....	
<b>Fig. R-25C:</b> Graphique du prise de poids dans la phase tardive du modèle carragénine .....	
<b>Fig. R-26A:</b> Graphique de l'activité MPO dans la phase précoce du modèle carragénine .....	
<b>Fig. R-26B:</b> Graphique de l'activité MPO dans la phase tardive du modèle carragénine .....	
<b>Fig. R-27A:</b> Graphique du test de la pince calibrée dans la phase précoce du modèle carragénine .....	
<b>Fig. R-27B:</b> Graphique des filaments de von Frey dans la phase précoce du modèle carragénine .....	
<b>Fig. R-27C:</b> Graphique du test de la pince calibrée dans la phase tardive du modèle carragénine .....	
<b>Fig. R-27D:</b> Graphique des filaments de von Frey dans la phase tardive du modèle carragénine .....	
<b>Fig. R-28:</b> Graphique du «Plantar test» dans la phase tardive du modèle carragénine .....	
<b>Fig. R-29:</b> Iconographie du marquage de FosB-LI au cours du temps .....	
<b>Fig. R-30:</b> Iconographie du marquage de FosB spécifique au cours du temps .....	
<b>Fig. R-31A:</b> Graphique du nombre de cellules FosB-LI dans les couches superficielles du segment lombaire de la moelle épinière des rats naïfs .....	
<b>Fig. R-31B:</b> Graphique du nombre de cellules FosB-LI dans les couches profondes du segment lombaire de la moelle épinière des rats naïfs .....	
<b>Fig. R-32A:</b> Graphique du nombre de cellules FosB-LI dans les couches superficielles du segment lombaire de la moelle épinière trois jours après traitement .....	
<b>Fig. R-32B:</b> Graphique du nombre de cellules FosB-LI dans les couches profondes du segment lombaire de la moelle épinière trois jours après traitement .....	
<b>Fig. R-33A:</b> Graphique de l'évolution au cours du temps du nombre de cellules FosB-LI dans les couches superficielles du segment L4 de la moelle épinière .....	
<b>Fig. R-33B:</b> Graphique de l'évolution au cours du temps du nombre de cellules FosB-LI dans les couches profondes du segment L4 de la moelle épinière .....	
<b>Fig. R-34A:</b> Iconographie de la localisation de nNOS dans la moelle épinière .....	
<b>Fig. R-34B:</b> Double marquage nNOS/ $\beta$ -dystroglycan .....	
<b>Fig. R-34C:</b> Double marquage nNOS/GLUT-1 .....	

**Fig. R-35:** Iconographie du marquage de nNOS au cours du temps dans les modèles carragénine et zymosan .....

**Fig. R-36:** Graphique du test de Randall-Selitto dans le modèle zymosan .....

**Fig. R-37:** Immunoreactivité de c-Fos dans la moelle épinière trois heures après traitement de carragénine .....

**Fig. R-38:** Double marquage nNOS/c-Fos dans les couches superficielles de la moelle épinière trois heures après traitement de carragénine .....

**Fig. R-39:** Double marquage nNOS/c-Fos dans les couches superficielles de la moelle épinière trois heures après traitement de carragénine (micrographie ApoTome) .....

**Fig. R-40:** Double marquage nNOS/FosB-LI dans les couches superficielles de la moelle épinière trois jours après traitement de carragénine.....

**Fig. P-41:** graphique du nombre de léchages après injection intrathécale de l'inhibiteur spécifique de nNOS 7-NINA .....

## ABREVIATIONS

ABC: *Avidine DH & Biotinylated horseradish peroxidase H reagents*  
AINS: Anti-inflammatoires non stéroïdiens  
AMPA:  *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate*  
ANAES: Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé  
AP-1: *Activating protein 1*  
ARNm: Acide Ribonucléique messenger  
BDNF: *Brain-derived neurotrophic factor* (facteur neurotrophique dérive du cerveau)  
BSA: Bovine Sérum Albumine  
cAMP: *cyclic adenosine 3,5 monophosphate*  
CCA: cortex cingulaire antérieur  
CDK5: *Cyclin-dependent kinase 5*  
c-Fos: *feline osteosarcoma*  
CGRP: *Calcitonine Gene Related Peptide*  
CIDN: contrôles inhibiteurs diffus induits par stimulation nociceptive  
COX: *cyclooxygenase*  
COX2: *ciclooxigenase 2*  
CREB: *cAMP response element binding protein* (protéine de liaison à l'élément répondant à l'AMPc)  
CREMEAS: Comité Régional d'Etique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg.  
Cy3: *Indocarbocyanine*  
DG: *anti- $\beta$ -dystroglycan*  
DLF: faisceau dorso-latéral  
DREZ: *Dorsal Root Entry Zone*  
EDRF: *Endothelium Derived Relaxing Factor* (vaisseau-relaxation)  
EFIC: *The European Federation of the International Association for the Study of Pain Chapters*  
EN: Echelle Numérique  
eNOS ou NOS III: *Endothelial Nitric Oxide Synthase*  
EVA: Echelle Visuelle Analogique  
EVS: Echelle Verbale Simple  
Fe/DETC:  $Fe^{2+}$ /*Diethyldithiocarbamate*  
FITC: *Fluorescein Isothiocyanate*  
FosB-LI: cellules immunoréactives pour FosB et  $\Delta$ FosB  
GABA: *acide gamma-amino-butyique*  
GCs: *Guanylate Cyclase soluble*  
GFAP: *Glial Fibrillary Acid Protein*  
GLUR2: *subunit 2 of AMPA ionotropic glutamate receptors*  
GLUT-1: *Glucose Transporter-1*  
GMPc: guanosine mono-phosphate cyclique  
HTAB: *Hexadecyltrimethylammonium Bromide*  
IASP: *International Association for the Study of Pain*  
ICF: *International Classification of Functioning, Disability and Health*  
IL: interleuquine  
iNOS ou NOS II: *Inducible Nitric Oxide Synthase*  
IRMf: Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle

IUD: Institut Ursa de la douleur  
L-NA: *N<sub>G</sub>-Nitro-L- Arginine*  
L-NAME: *N<sub>G</sub>-Nitro-L- Arginine Methyl Ester hydrochloride*  
L-NMMA: *N<sub>G</sub>-MonoMethyl-L- Arginine*  
LT: leucotriènes  
MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinases*  
MPO: *Myeloperoxidase activity*  
NADPH: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*  
NGF: *nerve growth factor* (facteur de croissance neuronale)  
NK1: *neuropeptide-K*  
NMDA: *N-Methyl-D- Aspartate*  
nNOS ou NOS I: *Neuronal Oxide Nitric Synthase*  
NNS: neurones nociceptifs non-spécifiques ou neurones à convergence  
NO: *Nitric Oxide*  
NO<sup>-</sup>: *Nitroxyl anion*  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: *Nitrite*  
NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: *Nitrate*  
NOS: *Nitric Oxide Synthase*  
NR1: *subunit 1 of NMDA receptor*  
NS: neurones nociceptive-spécifique  
OMS: Organisation Mondiale de la Santé  
ONOO<sup>-</sup>: *Peroxynitrite*  
PAG: *periaqueductal grey matter* (substance grise périaqueducule)  
PAF: paraformaldéhyde  
Pb: noyau parabrachial  
PBS: *Phosphate Buffer Saline*  
PBST: triton X-100 dans PBS.  
PK: *protéine kinase*  
PVG: *periventricular grey matter* (substance grise périventriculaire), sites dans le NRM:  
*nucleus raphe magnus* (noyaux du raphé magnum)  
RPE: résonance paramagnétique électronique  
RVM: *rostral ventromedial medulla* (moelle ventromedial rostral)  
Sc: sous-cutanée  
7NI: 7-nitroindazole  
7-NINA: *7-Nitroindazole monosodium salt*  
SFETD: Société Française d'Etude et de Traitement de la Douleur  
SGPA: Substance grise périaqueducule  
SI: cortex somesthésique primaire  
SIE: élément inductible par SIS  
SNC: Système Nerveux Central  
SNP: Système Nerveux Périphérique  
SNS: *specific sodium channel* (canal sodium spécifique)  
SP: substance P  
SRD: *subnucleus reticularis dorsalis*  
SRE: élément de réponse au sérum  
SRF: serum response factor  
STAT: *signal transducers and activators of transcription*  
TEP: Tomographie par émission de positons  
TNF: *tumor necrosis factor*  
TNS: Taylor Nelson Sofres

TrkA: *tyrosine-kinase A*

TX-100: Triton X-100

VLF: faisceau ventro-latéral

VPL: Noyau ventral postéro latéral du thalamus.

VPM: Noyau ventral postéro médian du thalamus

VR1: vanilloïde récepteur 1

WDR: *wide dynamic range*

# I. Introduction

*Qui cherche la vérité de l'homme doit s'emparer de sa douleur*

*Georges Bernanos*

*La Joie. Première partie. Chap 21. Plon*

## I. INTRODUCTION

Qui n'a pas ressenti la douleur au moins une fois dans sa vie? La douleur est donc une expérience universelle (à l'exception des personnes atteintes d'analgésie congénitale) et complexe incluant différentes composantes, physiologique, psychologique, cognitive et mnésique.

La douleur soulève également des questions de santé publique, car son soulagement est de plus en plus considéré comme un droit de l'homme. Bien que des données épidémiologiques sur la douleur couvrant l'Union Européenne ne soient pas disponibles, il est évident que la douleur est une condition très courante. Elle induit un lourd fardeau financier mais représente aussi un marché important pour les grands laboratoires pharmaceutiques. En effet, les ventes de médicaments pour soulager la douleur ont atteint 25 milliards de dollars en 2001, dont 13,25 milliards de dollars pour les seuls médicaments soulageant la douleur inflammatoire. Les médicaments les plus vendus sont les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (Renfrey et coll., 2003). Les prévisions du marché des médicaments antalgiques pour l'année 2010 sont de 40 milliards de dollars.

D'après «The European Federation of the International Association for the Study of Pain Chapters (EFIC)», plusieurs enquêtes réalisées dans différents pays de la communauté européenne montrent que 50% des adultes souffrent d'un ou de plusieurs types de douleurs à un moment donné de leur vie, la population la plus affectée étant celle de personnes âgées. Une proportion importante des personnes interrogées présentent une douleur chronique et sévère, les conditions les plus répandues étant le mal de dos, l'arthrite et le mal de tête récurrent. Bien que tous les types de douleurs soient importants, la douleur chronique a souvent été négligée par le corps médical. La gravité de ce type de douleur se traduit par une perte sévère de la qualité de vie des patients ayant des conséquences sur l'activité économique des pays.

En France, les chiffres sont proches de ceux de la communauté européenne. En effet, d'après une enquête TNS Sofres (2003), plus des trois quarts (78%) des personnes ayant répondu à l'enquête ont indiqué avoir été confrontées à la douleur et 54% ont déclaré avoir souffert de douleurs au cours des deux dernières années. Une proportion de 67% de ces personnes ont consulté un médecin généraliste et les traitements reçus étaient: les AINS, le paracétamol et les antalgiques opiacés faibles. Finalement, 96% des personnes interrogées s'accordent à dire que des progrès doivent être réalisés dans le domaine de la douleur. En

2002, le ministère de la santé a consacré 11,4 millions d'euros à la lutte contre la douleur dans le cadre de la dotation régionalisée des dépenses hospitalières au titre des mesures de santé publique (Mattei, 2002). Le coût s'élève à 14 millions d'euros pour la période 2006-2010.

Malgré toutes les actions menées par différents organismes internationaux tels que l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'«International Association for the Study of Pain» (IASP), sa filiale européenne EFIC, l'Institut UPSA de la douleur (IUD) ainsi que des institutions locales comme l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES), il reste encore beaucoup à faire pour prendre en charge la douleur. L'accroissement de la recherche sur la douleur pourrait aider, non seulement à mieux comprendre les mécanismes de la douleur, mais aussi à prévenir traiter et soulager les douleurs aiguës et chroniques et améliorer ainsi la qualité de vie de patients appartenant à des catégories aussi variées que les nouveau-nés et prématurés ou les personnes âgées et handicapées.

Nous avons choisi d'étudier plus particulièrement la douleur inflammatoire. Les études fondamentales sur cette catégorie de douleur font souvent appel à des modèles basés sur l'induction d'une inflammation de la patte du rat par des agents tels que la carragénine ou le zymosan. Ces modèles sont la plupart du temps utilisés pour étudier la phase précoce qui dépasse rarement les premières 24 h. Plusieurs études ont toutefois démontré que l'hyperalgie persiste bien au-delà de la première journée. Ces données de la littérature nous ont conduits à orienter notre recherche dans deux directions. En premier lieu, il nous a semblé intéressant de disposer d'un test de nociception mécanique, simple à utiliser, reproductible et sensible. Dans ce but, nous avons testé un nouvel appareil composé d'une pince dotée de capteurs de pression. En second lieu, nous avons pensé qu'il est souhaitable de disposer d'un marqueur de la phase tardive de l'hyperalgie induite par l'inflammation. Nous avons émis l'hypothèse que  $\Delta$ FosB pourrait remplir ce rôle en raison de la persistance de son expression à long terme, contrairement à c-Fos qui ne peut être utilisé qu'à court terme. En plus des deux approches qui viennent d'être citées, nous avons réalisé une étude préliminaire du rôle de l'enzyme de synthèse neuronale (nNOS) de l'oxyde nitrique (NO) dans la persistance de la douleur.

L'état des connaissances relatives aux travaux de cette thèse, présenté dans une première partie, traite de la douleur inflammatoire, des modèles d'étude de la douleur, du rôle des facteurs de transcription de la famille Fos et du rôle du NO. Ces chapitres bibliographiques se terminent par une présentation de différentes étapes du travail réalisé.

## **1. LA DOULEUR**

### **1.1 Généralités**

#### **1.1.1 Historique**

Qu'est-ce que la douleur? Le terme «dolor» qui signifie punition ou peine est la racine latine du mot douleur en français, «dolore» en italien et «dolor» en espagnol. En fait, le concept de douleur a changé avec le temps, en grande partie, en raison des interprétations philosophiques et religieuses dont il a fait l'objet.

Les sources historiques utilisées sont tirées des ouvrages de Bonica, 1990 ; Rey, 2000 et Sabatowski et coll., 2004.

Les anciennes cultures avaient une conception magique et/ou religieuse de la douleur. Selon ces cultures, la douleur induite par une blessure par exemple, est le résultat d'influences exercées par les dieux ou des esprits de la mort.

Dans l'antiquité classique, d'après Hippocrate la douleur est causée par un déséquilibre des quatre humeurs: sang, phlegme, bile jaune et bile noire. Dans le «corpus hippocratus» la douleur est acceptée comme un fait hors de toute valorisation. Plus populaire a été l'opinion d'Aristote pour qui le cœur constitue la «sensorium commune», le centre de la perception sensorielle de l'âme et de toutes les fonctions fondamentales de la vie. La douleur était d'après lui une passion de l'âme. Pour Galien, la douleur est un changement d'un état à un autre du fait de modifications internes ou externes de sorte qu'elle peut devenir un élément de diagnostic. Il met en avant l'idée que la douleur, comme toutes les modalités sensorielles, requiert la perception, c'est-à-dire la conscience. Avicenne définit pour sa part la douleur comme une modification des humeurs. Au Moyen-âge, la notion de douleur s'accorde avec la façon de vivre la foi qui méprise le corps, et considère que celle-ci est rédemptrice. Cette conception perdurera jusqu'à la fin du XIIème siècle. A la Renaissance, la douleur commencera à être perçue dans un cadre laïc, c'est-à-dire comme un évènement qui concerne l'homme dans son existence et son vécu propre, indépendamment de sa position devant la transcendance, Selon cette conception, les interprétations relatives au fonctionnement du corps doivent se soumettre à la raison. Pour Descartes, le corps est une machine vaste et complexe. Sa conception physiologique de la douleur est inspirée de Galien selon lequel les « esprits animaux » agissent d'une manière spécifique sur les nerfs alors que le réceptacle des sensations et le siège de l'âme se trouvent dans la glande pinéale (Figure 1). Ainsi la question

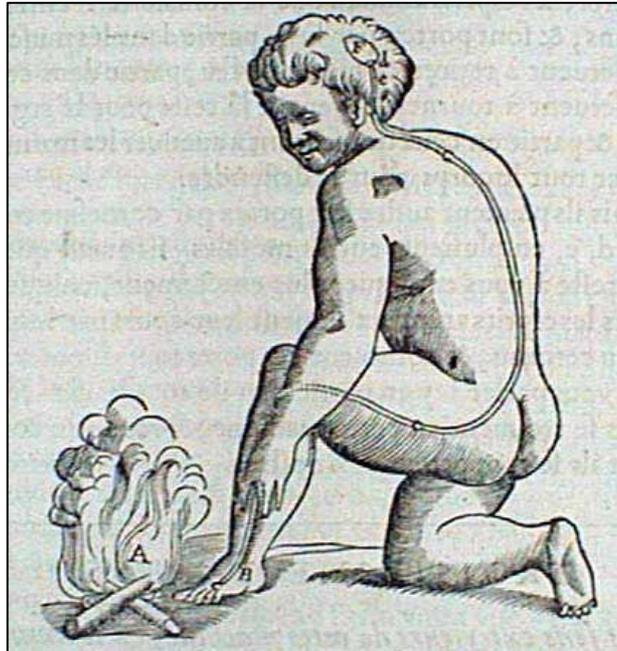


Figure 1. La transmission de la douleur d'après Descartes

de la douleur est posée dans un contexte mécanistique mais aussi dans un questionnement de la sensation. La douleur est une perception de l'âme qui confirme au corps son existence, et qui est traitée comme un moyen adéquat pour connaître l'union de l'âme et du corps.

Au siècle des Lumières, celui de l'émergence de la raison comme principe d'explication du monde, la médecine est basée sur l'observation et la recherche de signes objectifs. Il s'en suit que l'idée de douleurs infligées par Dieu est irrationnelle. La douleur est reconnue comme nuisible et sa conception se situe dans une perspective nosologique et sémiologique. La description de la douleur devient donc fondamentale dans le diagnostic d'une maladie, lequel s'appuie sur les quatre formes de douleur de Galien (tensive, gravative, pulsative et pongitive). A la fin du XVIIIème siècle, la douleur est définie comme une perception désagréable. Avec Albrecht Von Haller et les débuts de la méthode expérimentale, la définition de la sensibilité et des fonctions respectives des nerfs et des muscles se trouve posée sur des bases plus scientifiques. En effet Haller distingue les diverses fibres nerveuses, leur nature, et leurs réactions. Il distingue les fibres sensibles, qui si elles sont stimulées, occasionnent de la douleur, et les fibres insensibles qui n'en occasionnent pas. Dans la même période, Xavier Bichat va déplacer l'approche de la douleur de l'organe au tissu, ainsi la douleur n'est plus seulement envisagée selon sa topographie, mais est abordée comme un phénomène dans un organisme complexe. De plus, pour Bichat la différence entre le plaisir et la douleur n'est qu'une question de quantité et la sensibilité, la stricte faculté de sentir.

### **1.1.2 Théories de la douleur**

Au début du XIXème siècle, un grand nombre d'études et d'expériences scientifiques ont conduit à une nouvelle conception de la sensation et de la physiologie de la douleur. Johannes Müller a développé la loi des Energies Sensorielles Spécifiques selon laquelle la qualité des sensations ne dépend pas des stimulus mais de l'organe sensoriel et des voies qui sont stimulées. En 1858, Moritz Schiff propose la théorie de la Spécificité et déclare que la douleur et le toucher sont des modalités sensorielles différentes disposant de voies nerveuses centrales et périphériques spécifiques. Cette théorie est reprise par Von Frey qui pense que les fibres de gros diamètre (G) transmettant le toucher et que les fibres de petit diamètre (P) transmettant les impulsions douloureuses empruntent des voies séparées et spécifiques menant aux centres cérébraux du toucher et de la douleur (Figure 2A). Alfred Goldscheider adhère à la théorie de la sommation. Il décrit en 1898 des points spécifiques de la peau sensibles à la

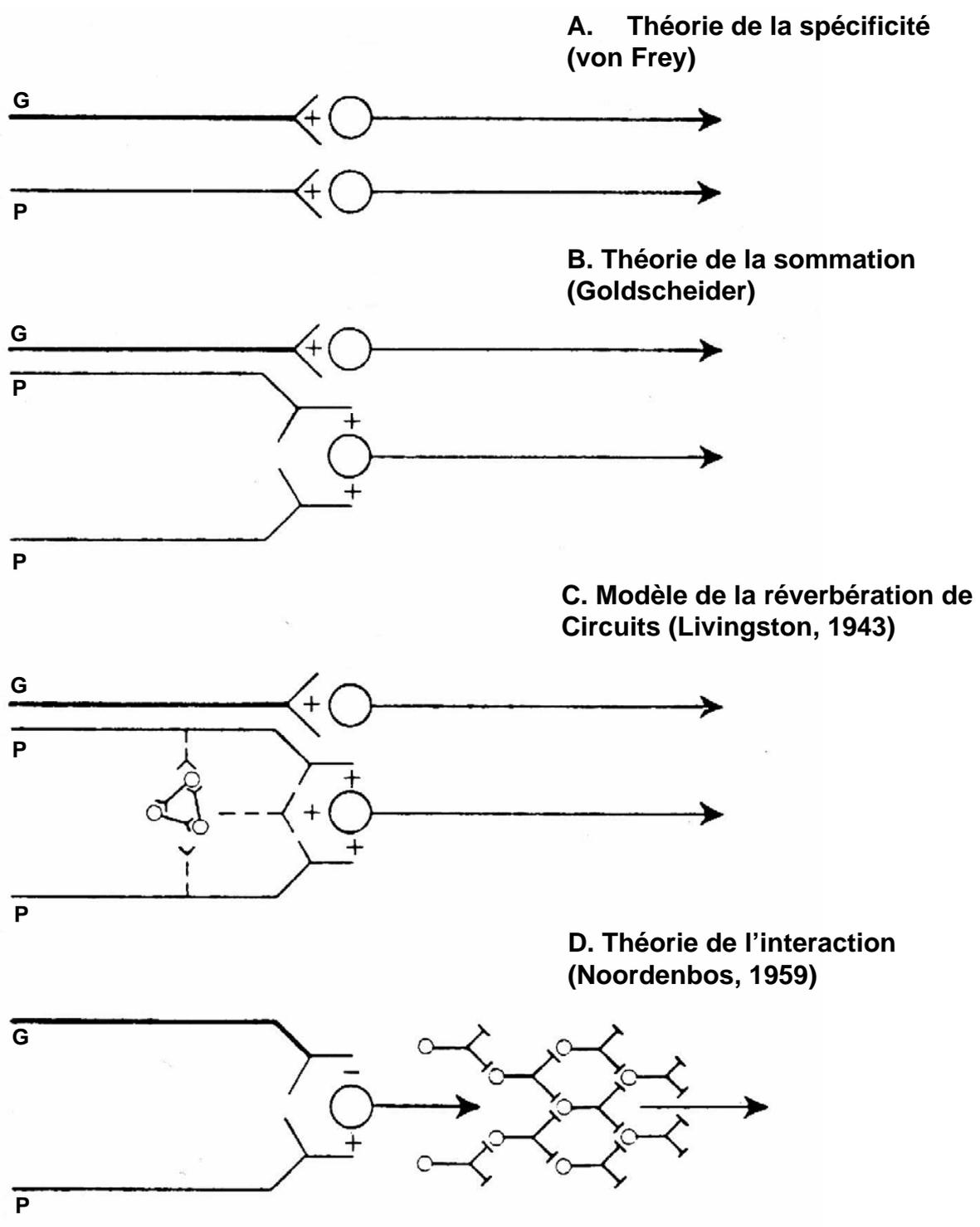
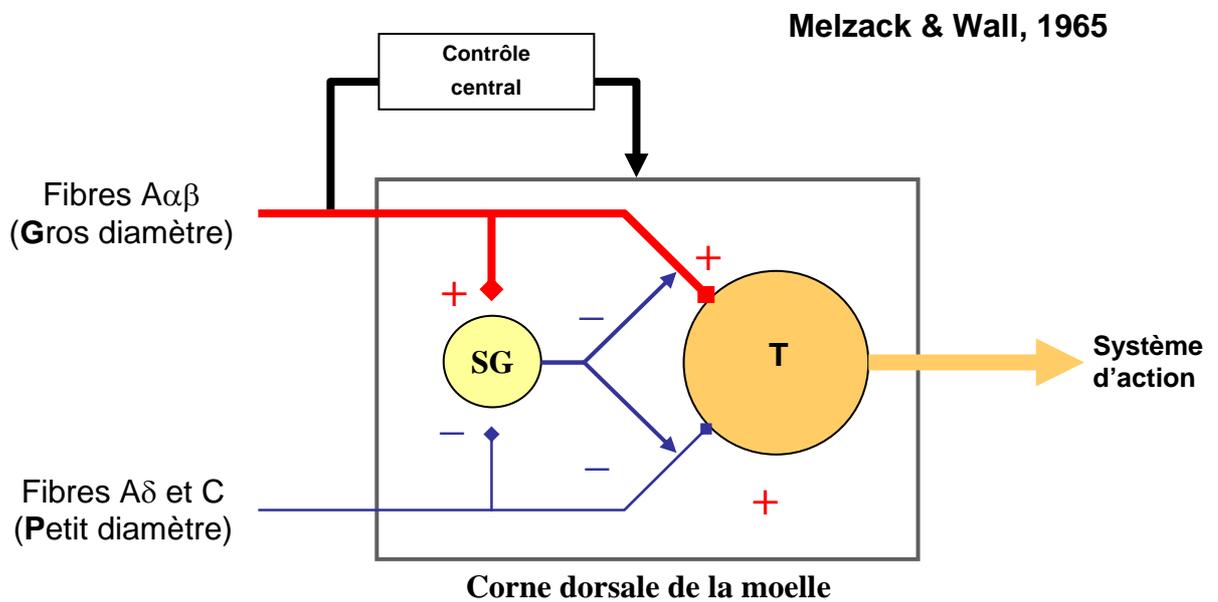
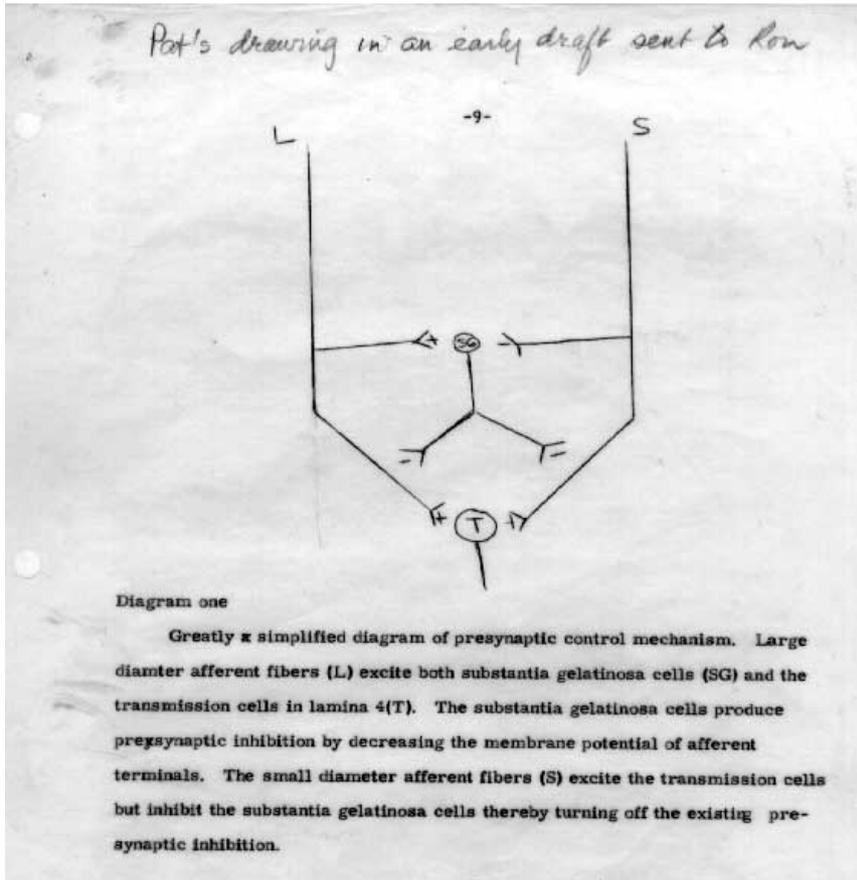


Figure 2. Schémas des différentes théories de la douleur.

pression ou à la douleur, en plus des points sensibles à la température. Il suggère que l'intensité du stimulus et la sommation centrale sont les déterminants principaux de la perception de la douleur. La douleur dépend de la convergence des fibres P vers la corne dorsale tandis que les fibres G transmettent le toucher (Figure 2B). De nouvelles théories apparaissent dans la première moitié du XXème siècle. La théorie du modèle périphérique, proposée par Sinclair et Weddell déclare que toutes les terminaisons des fibres se ressemblent, de sorte que la douleur est produite par la stimulation intense des récepteurs non spécifiques. Le modèle conceptuel de réverbération des circuits proposé par Livingston suggère qu'une stimulation nociceptive intense active des fibres projetant vers des interneurons mis en commun dans la moelle épinière qui produisent une activité de réverbération anormale dans le circuit en boucle des neurones auto-excités (Figure 2C). Une telle activité, anormale et prolongée, bombarde les cellules spinales projetant vers les structures cérébrales impliquées dans la perception de la douleur. Parmi les autres théories de la douleur, celle de l'Interaction Sensorielle, proposée par Noordenbos en 1959, propose que les fibres G inhibent (-) tandis que les fibres P excitent (+) les neurones centraux de transmission qui projettent vers un système multi synaptique conduisant au cerveau (Figure 2D).

Une nouvelle théorie proposée en 1965 par Melzack and Wall (Figure 3) est connue sous le nom de la théorie du «gate control», de la porte ou du portillon. D'après cette théorie, les fibres nerveuses G et P projettent vers la substance gélatineuse (SG) et les premières cellules centrales de transmission (T). L'effet inhibiteur de la SG sur les terminaisons afférentes est accru par l'activité des fibres G et diminué par celle des fibres P. Il existe également des voies nerveuses d'origine centrale qui projettent vers le système de la porte, tandis que les cellules T projettent vers les structures supra-spinales. En 1968, Melzack and Casey étendent la théorie en incluant les aspects motivationnels, affectifs et cognitifs de l'expérience de la douleur. Ces aspects conduisent à ajouter au système précédent l'interaction des systèmes de projection néospinothalamique et paléospinothalamique et les processus néocorticaux. Cette théorie a été complétée en 1977 par Jessell et Iversen, d'après lesquels l'inhibition des fibres nociceptives par un interneurone dépendrait de la libération d'un neurotransmetteur, enképhaline ou/et GABA, inhibant la libération, de neurotransmetteurs tels que des acides aminés excitateurs, ou des neurokinines. Melzack et Wall ont modifié cette théorie en 1982 en introduisant les liens excitateurs et inhibiteurs qui partent de la substance gélatineuse vers les cellules de transmission et le contrôle descendant inhibiteur provenant des systèmes du tronc cérébral. Même si les mécanismes physiologiques mis en avant pour expliquer la théorie du portillon ont évolué, le concept de base reste pertinent.



**Figure 3. Schéma de la théorie du portillon.** L: fibres de gros diamètre, S: fibres de petit diamètre, SG: substance gélatineuse, T: cellules centrales de transmission.

Melzack a proposé un nouveau concept en 1999 qui intègre le modèle du portillon dans un système de relations nerveuses auquel il donne le nom de «neuromatrix». L'argumentation de Melzack est fondée sur l'analyse du phénomène du membre fantôme qu'il interprète comme la preuve que la perception d'un membre ou de toute autre partie du corps peut résulter de la seule activité de circuits neuronaux. Par extrapolation, il admet que toutes les perceptions, y compris la douleur, peuvent être ressenties en absence de stimulations sensorielles. Les circuits neuronaux et les connexions synaptiques impliqués dans une telle perception représenteraient le support anatomique de la «neuromatrix» dont l'organisation génétiquement programmée serait modulée par les expériences sensorielles, en particulier celles qui sont produites par des lésions. En s'appuyant sur cette théorie, Melzack voit dans le stress un facteur important de la douleur chronique. En effet, l'action prolongée du cortisol libéré lors d'un stress, peut produire des lésions des tissus musculaire, osseux et nerveux et une dépression du système immunitaire. Ces conditions destructrices laisseraient une trace mnésique sur la «neuromatrix» conduisant à des douleurs chroniques, résistantes aux traitements pharmacologiques développés pour lutter contre les aspects sensoriels de la douleur.

Un nouveau point de vue exprimé ces dernières années par A.D. Craig (Craig, 2002, 2003) considère la douleur comme un des aspects de la représentation de la condition physiologique du corps (intéroception), différent de la perception tactile (extéroception). La douleur est ainsi une émotion homéostatique incluant à la fois une sensation et une motivation au même titre que la température, la soif et la faim. Ce système inclut une voie intéroceptive spino-thalamo-corticale, présente seulement chez les primates et bien développée chez les humains qui fournit une image de l'état du corps au cortex cérébral et conduit à une méta-représentation subjective des sensations du corps associées à l'émotion. Il est à noter que les théories actuelles essaient d'intégrer un maximum de facteurs physiologiques et génétiques. En revanche, il est difficile de tenir compte d'autres facteurs spécifiques à l'espèce humaine tels que les facteurs socioéconomiques, culturels ou religieux.

### **1.1.3 Définition de la douleur**

Beaucoup de scientifiques et de cliniciens s'appuient sur le fait que la douleur est un problème clinique complexe dont l'évaluation dépend d'un témoignage verbal, donc subjectif, pour affirmer que l'on ne peut pas définir la douleur.

L'OMS, dans le Chapitre 2 intitulé Fonctions sensorielles et douleur: «International Classification of Functioning, Disability and Health» (ICF, 2001; ICD-10, 2004), définit la douleur comme «une sensation désagréable qui indique une lésion réelle ou potentielle d'une structure corporelle». La sensation peut être généralisée ou localisée à plusieurs parties du corps. Il peut s'agir par exemple d'un élancement, d'une douleur brûlante ou de douleur sourde.

Malgré toutes ces difficultés, Merskey a donné en 1964 la définition opérationnelle suivante: «expérience désagréable, liée essentiellement à une lésion tissulaire ou décrite en termes évoquant une telle lésion ou toutes les deux». Par la suite cette définition a été acceptée par le sous-comité de taxonomie de l'IASP qui a modifié la définition en proposant que la douleur soit une «expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, liée à une lésion tissulaire existante ou potentielle, ou décrite en termes évoquant un telle lésion». Cette définition, ainsi que tous les termes relatifs à la douleur, ont été publiés en 1979 par l'IASP. C'est la définition générale de la douleur la plus acceptée dans le monde.

Il me semble pour ma part que cette définition de la douleur devrait également inclure, dans un modèle multidimensionnel, les expériences cognitives et socioculturelles qui pourraient être impliquées dans la perception de la douleur chez les humains.

Il est important avant de poursuivre la description de la douleur, de faire la différence entre douleur et nociception ainsi qu'entre douleur et souffrance. La nociception désigne le système physiologique qui permet de détecter les stimulations susceptibles de menacer l'intégrité de l'organisme. La souffrance est pour sa part, un état de détresse sévère associé à des événements qui menacent l'intégrité corporelle, physiologique, émotionnelle ou morale de la personne ou considérés comme tels par cette personne qui peut être ou non associé à la douleur.

Les annexes de ce manuscrit contiennent un glossaire de définition des concepts ayant une relation avec la douleur (définitions de l'IASP) utilisés dans le texte.

#### **1.1.4 Classification et évaluation de la douleur**

Traditionnellement le corps médical classe la douleur en douleur aiguë et douleur chronique, le critère de différenciation entre les deux étant temporel. La durée d'une douleur aiguë est inférieure à 3 mois et celle d'une douleur chronique est supérieure à 3 mois. Les douleurs chroniques ne constituent pas un groupe homogène et se divisent en, au moins deux grandes catégories : les douleurs liées à une pathologie évolutive, notamment maligne (ex.

cancer ou SIDA) et les douleurs chroniques non malignes, liées à une pathologie séquellaire, peu ou pas évolutive (lésion post-traumatique, lésion nerveuse...).

Le corps médical distingue aussi plusieurs types de douleurs selon le mécanisme physiopathologique:

- Par excès de nociception : Le stimulus nociceptif est prolongé et la réaction inflammatoire intense est due à l'excès de stimulation des fibres nociceptives par des stimulus mécaniques, thermiques, chimiques ou électriques (ex. douleur postopératoire, post-traumatique, viscérale)
- Par lésion périphérique ou centrale du système nociceptif : Ce sont des douleurs neuropathiques, neurogènes ou de déafférentation dues à la compression l'infection ou la destruction de nerfs (ex. hernie discale, zona, douleur fantôme)
- Par stimulation locale du système sympathique, à l'origine de troubles vasomoteurs, trophiques (ex. causalgie, algodystrophie)
- Par désordre émotionnel sévère modifiant l'intégration du message douloureux conscient (douleurs psychogènes)
- Par des mécanismes mal connus ou douleurs *sine materia* (ex. céphalées de tension, fibromyalgies, douleurs myofasciales)
- Par des mécanismes mixtes (ex. douleurs cancéreuses).

Cependant établir la classification des syndromes douloureux est difficile en raison des divergences d'opinion entre scientifiques et cliniciens de différentes disciplines d'une part et de spécificités régionales et de langage d'autre part. Les propositions faites en 1979 par John Bonica et Denise Albe-Fessard ont permis au sous-comité de taxonomie de l'IASP, sous la direction d'Harold Merskey, d'initier une classification des syndromes douloureux qui a abouti en 1994 au système de classification de l'IASP, fondé sur 5 critères:

- I. Région anatomique concernée
- II. Système physiologique impliqué
- III. Caractéristiques temporelles de la douleur et patrons d'occurrence
- IV. Prise en compte de la déclaration de la douleur par le patient comme le critère définissant le début de la phase de douleur
- V. Etiologie de la douleur

Bien que cette classification ne soit pas complète, elle a représenté une grande avancée dans la recherche et le traitement de la douleur.

Plusieurs méthodes simples sont disponibles chez les humains pour évaluer la douleur (Boureau, 2001). Elles reposent soit sur la description verbale (auto-évaluation), soit sur l'observation du comportement (hétéro-évaluation), mais il est important de standardiser la façon d'évaluer l'intensité de la douleur. Différentes échelles se proposent d'apprécier globalement l'intensité de la douleur: Echelle Verbale Simple (EVS), Echelle Numérique (EN), Echelle Visuelle Analogique (EVA). Ces échelles sont utilisées directement par le patient pour décrire sa douleur, ce sont des échelles d'évaluation.

Un autre type d'évaluation repose sur l'examen de la sensibilité cutanée dans la zone douloureuse par comparaison avec une zone de référence. Elle permet la mise en évidence de signes déficitaires (anesthésie, hypoalgésie) ou de signes d'hyperesthésie (hyperalgésie, hyperpathie). L'examen inclut: la sensibilité tactile non nociceptive (au coton ou au doigt), la sensibilité tactile à la douleur (perception de la piqûre d'une aiguille), la sensibilité thermique (tubes d'eau chaude à 40-45°C ou froide à 5-10°C), la sensibilité mécanique (pression) et vibratoire.

### 1.1.5 Traitements de la douleur

#### 1.1.5.1 Traitements médicamenteux

Les médicaments pour soulager la douleur sont prescrits en tenant compte des niveaux d'intensité selon des paliers définis par l'OMS (2004)

**Tableau 1. Médicaments pour soulager la douleur en fonction de paliers définis par l'OMS à partir d'une Echelle Visuelle Analogique (EVA)**

<b>Douleur faible:</b> EVA < 4	<b>Douleur modérée:</b> 4 < EVA < 7	<b>Douleur forte:</b> EVA > 7
<b>Palier I</b> Antalgiques non opioïdes	<b>Palier II</b> Antalgiques opioïdes faibles	<b>Palier III</b> Opioïdes forts
Aspirine Paracétamol Néfopam AINS	<b>Palier IIa</b> Codéine, Dextropropoxyphène Tramadol <b>Palier IIb</b> Nalbuphine, Buprénorphine	Morphine à libération immédiate (sirop de morphine) Morphine à libération prolongée (hydromorphone, oxycodone, péthidine, fentanyl) Morphiniques par voie parentérale

### **1.1.5.2 Moyens invasifs pour soulager la douleur**

#### *1.1.5.2.1 Neurolyse*

Le principe de la neurolyse comme thérapie antalgique repose sur l'hypothèse que la propagation du message douloureux sera supprimée en interrompant la conduction dans la fibre sensitive. En fait, la neurolyse est le plus souvent partielle, non sélective avec atteinte du contingent moteur et sympathique du nerf et de durée d'action limitée, souvent imprévisible, de quelques heures à quelques mois. Les produits utilisés pour les neurolyses sont l'alcool à des concentrations de 50 % ou de 100 % mais dont l'injection est douloureuse ou le phénol en solution aqueuse à 5 % ou en solution glycinée à 6 %, seule solution utilisable en cas de neurolyse intrathécale.

#### *1.1.5.2.2 Neurochirurgie*

Les techniques neurochirurgicales sont réservées aux patients qui ne peuvent pas être soulagés par des techniques plus simples ou qui le sont mais au prix d'effets secondaires trop importants. On distingue habituellement :

##### *- Neurostimulation.*

Elle est indiquée en cas de douleurs neuropathiques et vise à renforcer l'action inhibitrice des grosses fibres à destinée lemniscale sur la transmission de l'influx nociceptif.

##### *- Techniques neuro-ablatives.*

Leur but est l'interruption du faisceau spinothalamique pour supprimer la conduction de l'influx douloureux.

##### *- Cordotomie antérolatérale*

La destruction du faisceau spinothalamique vise à obtenir une analgésie de l'hémicorps opposé au-dessous du niveau de la lésion créée. Elle peut être obtenue soit par une technique chirurgicale ouverte, laminectomie ou par une électrocoagulation par voie percutanée sous anesthésie locale.

*- Tractotomie mésencéphalique stéréotaxique.*

Elle consiste dans la destruction par coagulation sous anesthésie locale du prolongement du faisceau spinothalamique à l'étage mésencéphalique .

*- Dreztomie*

L'ablation de la zone radiculo-médullaire (*Dorsal Root Entry Zone :DREZ*) est une intervention qui consiste dans une interruption microchirurgicale sélective des fibres nociceptives de petit calibre à leur entrée au niveau de la moelle en respectant les fibres de gros calibre destinées au cordon dorsal qui seraient responsables du "contrôle du portillon" selon la théorie de Melzack et Wall (1965).

## **1.2 Bases anatomiques et physiologiques de la nociception**

Un organisme vivant est en échange permanent avec son milieu interne et externe dont il reçoit de nombreuses informations sensorielles. On distingue depuis Aristote cinq modalités sensorielles principales: la vision, l'audition, le goût, l'odorat et le toucher. D'autres modalités, proprioceptives et intéroceptives renseignent sur l'équilibre, la tension musculaire et le milieu intérieur. Ces informations sensorielles peuvent être réflexes ou conscientes. Le terme de somesthésie définit les perceptions conscientes ayant pour origine les différentes stimulations cutanées et somatiques. On reconnaît quatre modalités : les sensibilités tactile, proprioceptive, thermique (froid et chaud) et la douleur. Si l'on considère la provenance des informations traitées, la somesthésie concerne trois types de sensibilité; extéroceptive pour la sensibilité aux stimulations extérieures; proprioceptive pour la position et le mouvement du corps et intéroceptive pour la sensibilité interne viscérale (Vibert et coll., 2005)

Bien qu'il soit admis qu'il existe cinq modalités sensorielles, la nociception peut être considérée comme une sixième modalité ayant pour but d'avertir d'un danger. Elle déclenche des réactions dont la finalité est de diminuer sa cause et d'en limiter les conséquences. Le terme nociception (le terme latin « *nocere* » signifie nuire) a été introduit par Sherrington pour désigner le système physiologique qui permet de détecter les stimulations susceptibles de menacer l'intégrité de l'organisme. On qualifie donc de nociceptives ces stimulations et les réponses induites. La nociception est un signal d'alarme qui détermine un ensemble des

réflexes et de comportements protecteurs comme le réflexe de retrait, l'immobilisation de la région lésée et le comportement d'évitement.

Les notions de nociception et de douleur ne sont pas superposables car la douleur n'est pas un stimulus. En clinique par exemple, il existe de lésions tissulaires sans perception de douleur et à l'inverse, la douleur peut se manifester en l'absence apparente ou réelle de stimulation nociceptive (ex. le membre fantôme). Le système qui génère la douleur peut également être l'objet de dysfonctionnements (Le Bars et Willer, 2004).

La nociception à l'égal des autres modalités sensorielles est organisée en trois grandes parties : 1) récepteurs sensoriels sensibles à une certaine forme d'énergie qui représente le stimulus transformé (transduction) en signal nerveux, 2) voies afférentes qui transmettent l'information sous la forme de potentiels d'action, 3) centres nerveux responsables de la perception.

### **1.2.1. Récepteurs sensoriels**

Un récepteur sensoriel est une structure cellulaire spécialisée qui sert d'interface entre l'énergie physique du stimulus et le système sensoriel. Il existe différents types de récepteurs.

- **Mécanorécepteurs:** Ce sont des récepteurs encapsulés qui répondent à des stimulations mécaniques. Ils sont reliés à des fibres afférentes myélinisées de gros diamètre A $\beta$ . Selon le type de décharge ils peuvent présenter une adaptation lente ou rapide au stimulus.
- **Thermorécepteurs:** Ce sont des récepteurs au froid et au chaud formés par des terminaisons libres reliées à des fibres myélinisées de fin diamètre A $\delta$  et à des fibres amyéliniques C.
- **Nocicepteurs:** Ce sont des récepteurs à terminaisons libres sensibles aux stimuli nociceptifs. Ils sont constitués par des terminaisons libres de très petite taille des fibres périphériques A et C localisés dans la peau, les muscles, les viscères, les articulations etc.... Ils peuvent répondre à trois types de stimulus, mécanique, thermique et chimique.

Les fibres nerveuses font partie du Système Nerveux Périphérique (SNP) et constituent la principale voie par laquelle le cerveau et la moelle épinière communiquent avec le reste du corps et son environnement. Ces fibres nerveuses peuvent être afférentes ou efférentes par

rapport au SNC. Le corps cellulaire des fibres afférentes est localisé dans les ganglions des racines dorsales de la moelle épinière pour le tronc et les membres ou dans les ganglions crâniens pour la face. Certaines fibres sont entourées d'une gaine de myéline, d'autres non. Le tableau ci-dessous montre les classifications des fibres les plus utilisées.

**Tableau 2. Catégories de fibres nerveuses selon les classifications utilisées  
(Lloyd pour le nerf musculaire ; Erlanger-Gasser pour le nerf cutané)**

<b>Nerf musculaire</b>	<b>Nerf cutané</b>	<b>Myéline</b>	<b>Diamètre (µm)</b>	<b>Vitesse de conduction (m/sec)</b>	<b>Qualification</b>
<b>I</b>		Oui	13-20	80-120	Non nociceptives (propriocepteurs, mécanorécepteurs)
<b>II</b>	Aβ	Oui	6-12	30-70	
<b>III</b>	Aδ	Oui	1-5	5-30	Nociceptives (nocicepteurs et thermorécepteurs)
<b>IV</b>	C	Non	0,2-1,5	0,5-2	

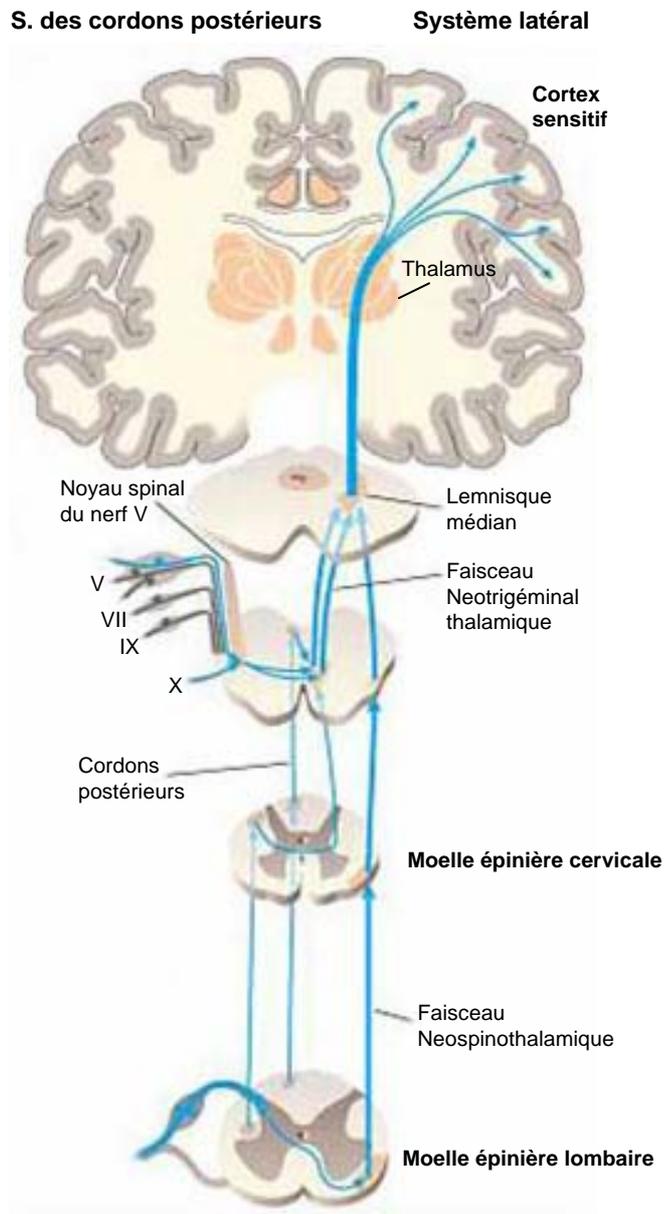
### **1.2.2 Voies nociceptives**

Les sensations somatiques comportent plusieurs composantes, sensori-discriminative, hédonique, affective-motivationnelle et cognitive-hédonique. Ces composantes s'influencent mutuellement et élaborent une propriété émergente du SNC, l'expérience subjective de la perception de douleur. La composante sensorielle décrit la localisation et l'ampleur du stimulus somatosensoriel, son intensité et ses qualités de texture. La composante hédonique indique l'aspect agréable ou désagréable de la sensation. La composante affective-motivationnelle produit le désir (la motivation) pour mettre fin, réduire ou échapper à une expérience nociceptive. Si le stimulus, même nociceptif, suscite le plaisir, il produit le désir de continuer ou augmenter une telle sensation (Price, 2000). C'est le cas par exemple, de la nourriture épicée. La composante cognitive-hédonique permet de prendre conscience du stimulus nociceptif et de lui attribuer un caractère agréable ou désagréable.

Les voies qui conduisent l'information sensorielle sont qualifiées de voies afférentes. Elles transportent les informations des récepteurs thermiques, tactiles, et nociceptifs vers le cerveau. Certaines de ces informations atteignent le cortex cérébral, alors que d'autres atteignent les centres supra-spinaux (tronc cérébral). La majeure partie des fibres ascendantes croisent la ligne médiane au niveau médullaire et gagnent le quadrant antérolatéral controlatéral. Les voies dites conscientes qui transportent les informations vers le cortex cérébral se caractérisent par une suite de trois neurones entre le récepteur périphérique et le cortex cérébral. L'axone du neurone de première ordre ou neurone afférent primaire dont le corps cellulaire se situe dans le ganglion spinal de la racine dorsale pénètre dans la moelle épinière par la racine dorsale d'un nerf rachidien. Le prolongement central peut se ramifier et établir des connexions synaptiques qui servent d'intermédiaires aux réflexes spinaux et à la coordination inter-segmentaire. La fibre principale reste du côté ipsilatéral de la moelle épinière et se termine par un contact synaptique avec le neurone de second ordre situé soit dans la substance grise médullaire, soit dans le bulbe rachidien. L'axone issu du corps cellulaire du deuxième neurone décusse du côté controlatéral et remonte vers le thalamus où il entre en contact avec le neurone de troisième ordre qui projette dans le cortex somatosensoriel du lobe pariétal de l'hémisphère cérébral.

- *Voie des cordons postérieurs : système lemniscal.*

Cette voie de communication très rapide est composée de fibres A $\beta$  transmettant des messages tactiles et proprioceptifs (Figure 4). L'information est transmise vers le bulbe par le cordon postérieur ipsilatéral. Les cordons postérieurs sont constitués principalement par les branches ascendantes des fibres sensorielles de premier ordre et de gros diamètre qui n'ont pas fait synapse au niveau médullaire. Il existe cependant des axones provenant de neurones spinaux de second ordre. Ces voies font l'objet d'une organisation somatotopique (membre inférieur dans la partie interne du cordon et membre supérieur dans la partie externe), qui se maintient à tous les étages de leur trajet, comprenant les noyaux des relais bulbaires, le thalamus et le cortex cérébral. Dans la partie caudale bulbaire, les fibres font relais dans le noyau de Goll (Gracilis) où transitent les informations issues du membre inférieur et du tronc, et le noyau de Burdach (Cuneatus) où transitent les informations issues du membre supérieur, du cou et de la région occipitale. Après relais, les messages gagnent le thalamus controlatéral par le lemnisque médian, avant de rejoindre le cortex pariétal. Avant d'atteindre le thalamus, les voies sensibles de ce système croisent dans le lemnisque médian, d'où le nom de système



**Figure 4. Schéma du Système des cordons postérieurs et du Système latéral.**

lemniscal. Les voies issues des cordons postérieurs aboutissent principalement dans le noyau ventral postérieur, plus précisément, dans la partie ventro-postérolatérale (VPL) pour le tronc et les membres et la partie ventro-postéromédiane (VPM) pour la face. Les neurones du thalamus latéral projettent vers le cortex somesthésique primaire (SI).

Récemment, l'accent a été mis sur l'implication des colonnes dorsales dans la transmission de la douleur viscérale (Willis et coll., 1999).

- *Voie des cordons antérolatéraux : système spinothalamique ou extralemniscal.*

Le faisceau spinothalamique ou néospinothalamique transmet les messages nociceptifs tactiles et thermiques. Les projections de ce faisceau vers le thalamus sont connues chez les humains, les singes, les chats et les rats (Willis et Coggeshall, 1991). Le faisceau spinothalamique a pour origine des cellules localisées dans les couches I et IV-VI de la corne dorsale de la moelle épinière qui reçoivent des projections des fibres afférentes primaires. Les corps cellulaires des neurones spinothalamiques sont localisés en grand nombre dans les segments spinaux C1 et C2 (Apkarian et Hodge, 1989). Les neurones spinothalamiques localisés dans les laminae I et V projettent latéralement, tandis que ceux localisés dans les couches profondes de la corne dorsale projettent médialement. Seule une petite fraction des neurones projette ipsi-latéralement vers le thalamus. La plupart des neurones projettent vers le thalamus controlatéral. Ils décussent à travers la commissure blanche ventrale, entrent initialement dans le faisceau ventral puis pénètrent dans le faisceau latéral. Les axones issus des neurones de la lamina I progressent d'abord dorsalement dans le faisceau latéral, et décussent dans la moelle épinière pour aller rejoindre le cordon antérolatéral controlatéral. Les axones transportant les informations nociceptives et thermiques décussent dans le segment spinal de leur origine à très courte distance du corps cellulaire, tandis que ceux qui transportent les informations tactiles peuvent remonter sur plusieurs segments avant de décusser. Dans le tronc cérébral, les fibres spinothalamiques cheminent à proximité du lemnisque médian. La majorité des fibres aboutissent dans le noyau ventral postérieur du thalamus dont le VPL et dans les noyaux intralaminaires. Les axones issus du VPL projettent dans le cortex somesthésique primaire tandis que ceux des noyaux intralaminaires projettent de façon diffuse sur différentes aires corticales comme les aires somesthésiques primaire et secondaire, l'aire prémotrice et le tronc cérébral et en particulier la formation réticulée bulbaire, pontique et mésencéphalique (Figure 4 et 5).

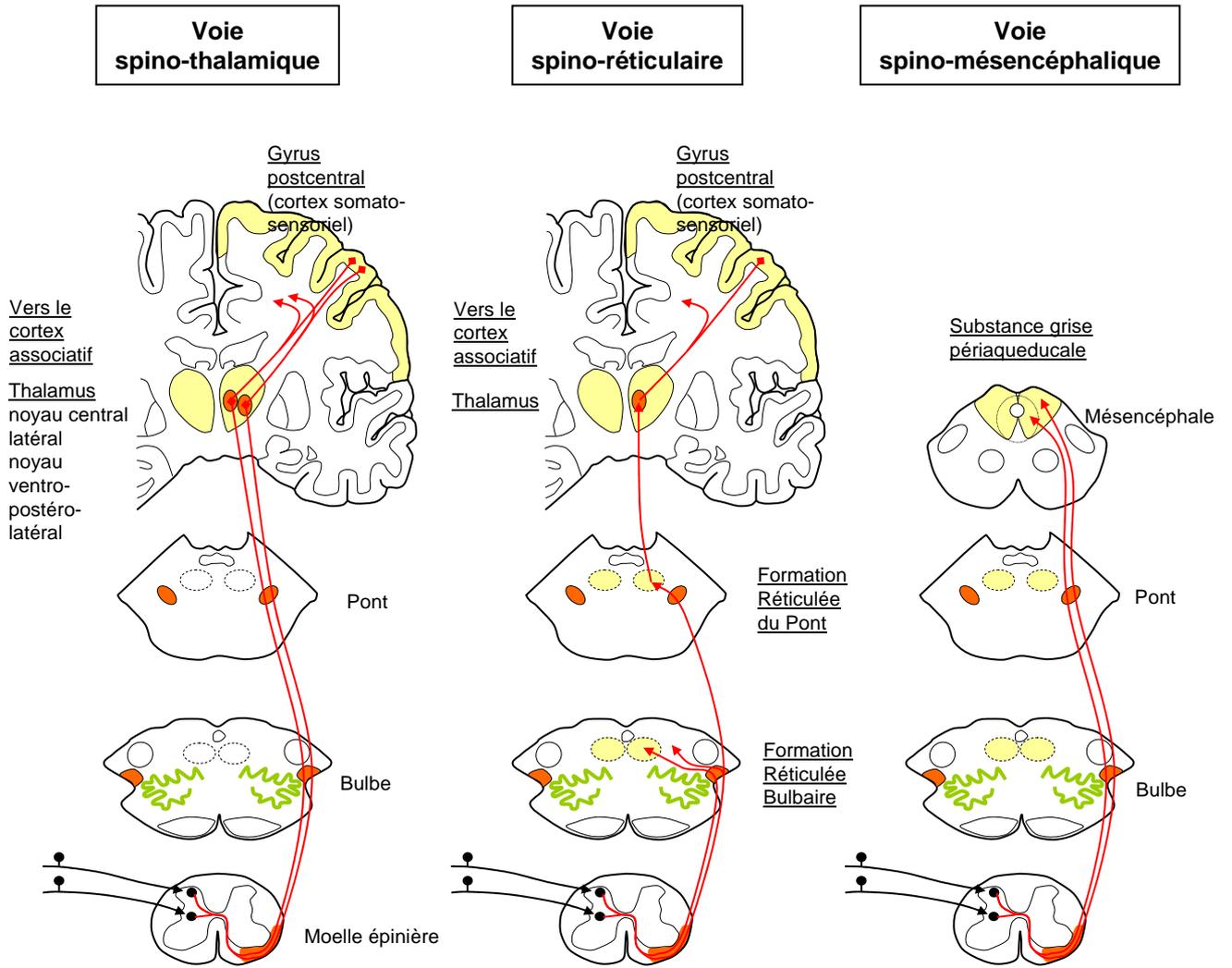


Figure 5. Système antérolatéral de la transmission nociceptive

Les cellules de projection du faisceau spinothalamique présentent des champs réceptifs excitateurs et inhibiteurs. Par exemple une forte inhibition de la perception de la stimulation de la peau se produit quand on utilise des stimulations nociceptives intenses, ce qui suggère la participation d'un mécanisme similaire aux contrôles inhibiteurs diffus (CIDN) induits par stimulation nociceptive (Willis et Westlund, 1997).

Dans la substance grise du quadrant antérolatéral de la moelle épinière, le faisceau spinothalamique est accompagné par les faisceaux spinomésencéphalique, spinoréticulaire et spinolimbique (Willis et Coggeshall, 1991; Willis et Westlund, 1997).

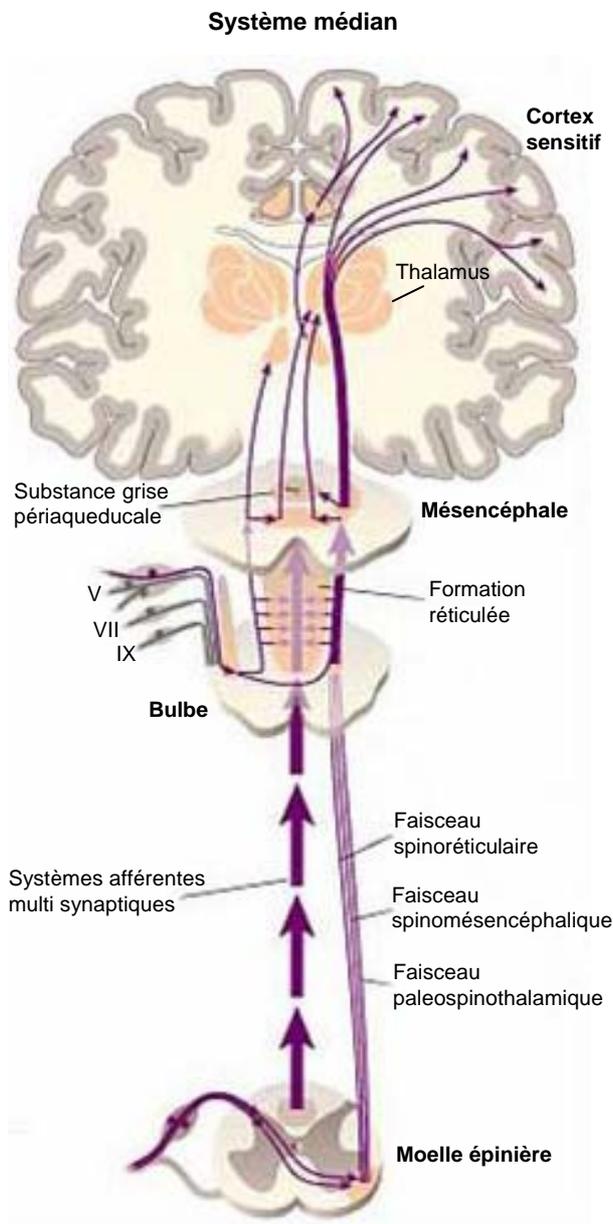
- *Le Faisceau spinomésencéphalique*

Le faisceau spinomésencéphalique inclut plusieurs systèmes de projections vers différentes aires du mésencéphale (Figure 5). Les cellules d'origine de ce faisceau sont réparties dans la moelle épinière de façon similaire à celles des cellules du faisceau spinothalamique, pour la plupart dans les laminae I et IV-VI, bien que quelques unes soient présentes dans la corne ventrale et la lamina X. Quelques axones de ce faisceau présentent des collatérales qui se terminent dans le thalamus latéral. Les neurones spinomésencéphaliques sont nociceptifs, ils répondent soit uniquement à des stimulations nociceptives soit à des stimulations nociceptives et inoffensives. Les différentes composantes du faisceau spinomésencéphalique peuvent avoir plusieurs fonctions. Par exemple les projections vers la SGPA peuvent contribuer au comportement aversif et à l'activation du système d'analgésie descendante qui commence dans la SGPA (Figure 7).

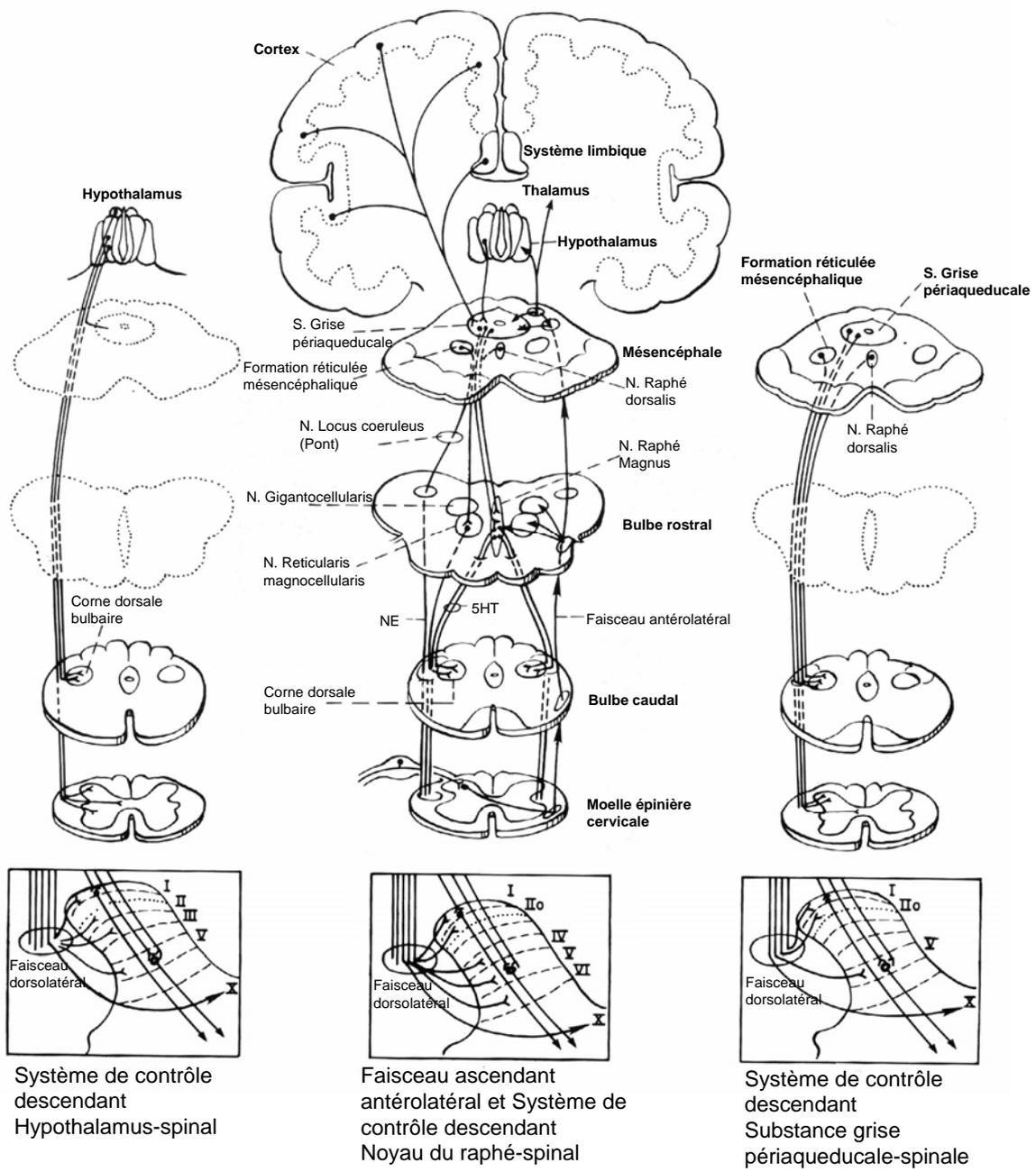
- *Le Faisceau spinoréticulaire ou paléospinothalamique.*

Le faisceau spinoréticulaire conduit la douleur lente, transmise de la périphérie par les fibres C jusqu'à la formation réticulée et la substance grise périaqueducule (SGPA), les noyaux gigantocellulaire et réticulaire latéral, le noyau parabrachial et une région très caudale, dénommée *subnucleus reticularis dorsalis* (SRD) (Figure 5). Plusieurs des cellules à l'origine du faisceau spinoréticulaire sont localisées dans les couches profondes de la corne dorsale, dans les laminae VII et VIII de la corne ventrale et projettent vers la partie caudale du bulbe. Les faisceaux spinothalamique et spinoréticulaire sont groupés dans la moelle épinière antérolatérale vers le tronc cérébral. (Bernard et Besson, 1990).

Le SRD situé dans la partie postérieure du bulbe à proximité de la jonction cervicobulbaire contient des neurones excités par des stimulus spécifiquement nociceptifs. Ce noyau est en connexion avec le tronc cérébral (noyau gigantocellulaire, aire parabrachiale), le



**Figure 6. Schéma du système médian.**



*D'après Bonica, 1990*

**Figure 7. Systèmes descendants endogènes de la modulation de la douleur.**

thalamus et avec la moelle épinière par de fibres qui projettent vers l'ensemble des segments médullaires via le faisceau dorsolatéral de la moelle. C'est donc une véritable plaque tournante de la nociception, jouant un rôle déterminant dans la modulation de ces messages.

Beaucoup de neurones réticulaires répondent aux stimulations nociceptives. La principale fonction de cette entrée est de signaler aux centres autonomes du tronc cérébral les changements homéostatiques. Les autres réponses du tronc cérébral incluent l'activation des systèmes d'analgésie endogènes et le relais d'informations qui déclenchent les réponses affectives et motivationnelles.

- *La Voie médiane*

En plus des projections spinothalamiques nociceptives classiques, des voies ascendantes nociceptives d'origine spinale projettent dans des aires spécifiques du tronc cérébral et rostralement dans plusieurs structures cérébrales chez le rat. Des données récentes (Monconduit et coll., 1999) indiquent qu'une voie projette de la corne dorsale de la moelle épinière au SRD dans le bulbe postérocaudal, puis au noyau ventromédian du thalamus qui transmet et code l'information nociceptive cutanée du corps entier vers la couche I du cortex antérieur (Figure 6). Une autre voie ascendante projette de la moelle épinière au noyau parabrachial (Pb), puis à l'hypothalamus et l'amygdale (Bernard et coll., 1996; Gauriau et Bernard, 2002). Des données supplémentaires suggèrent que l'information nociceptive peut être transmise du Pb au noyau para-central thalamique qui projette vers le striatum et le cortex préfrontal. Une voie pourrait transmettre l'activité nociceptive du Pb aux noyaux intralaminaires du thalamus et de là au cortex frontal (Bourgeois et coll., 2001a; Desbois et Villanueva, 2001). Une autre voie envoie des projections du Pb vers le noyau central de l'amygdale qui projette vers la *substantia innominata dorsalis*, le noyau du lit de la strie terminale et l'hypothalamus postérieur (Bourgeois et coll., 2001b). Ces voies joueraient un rôle dans la composante émotionnelle de la douleur et dans l'interaction entre la douleur et le processus cognitif.

Sewards et Sewards (2002a, b) ont proposé que la représentation des composantes sensorielles et hédoniques soit traitée et représentée par des voies parallèles séparées. Ils suggèrent ainsi une séparation dans chacune des structures somatosensorielles: la moelle épinière, le complexe du trijumeau, le thalamus posteromédian ventral et posterolatéral ventral, et les aires du cortex somatosensoriel. Les deux composantes de la sensation somatique sont détectées par des populations séparées de récepteurs, les nocicepteurs pour la

composante hédonique négative, et les mécanorécepteurs à bas seuil pour la composante sensorielle.

Récemment Vogt et Sikes (2000) ont proposé que l'aspect motivationnel soit porté par la voie médiane qui comprend les noyaux intralaminaires du thalamus et une aire nociceptive à l'intérieur du cortex cingulaire antérieur (CCA). Les auteurs suggèrent que la voie médiane de la nociception est séparée et différente des voies latérales et qu'il y a des interconnexions entre les deux systèmes.

Les voies sensorielles qui transmettent les informations nociceptives rassemblent simultanément des informations de différentes sources. Ainsi l'idée que la nociception est véhiculée par des canaux de transmission spécifiques semble peu appropriée. La cause en est peut-être que le cerveau dispose de beaucoup de routes et élabore diverses stratégies pour modifier l'information entrante. En conséquence, la sensation n'est pas simplement une copie de chaque stimulus dirigé vers le SNC. La sélection des signaux est une caractéristique fondamentale de la sensation, ce qui permet de comprendre pourquoi des processus périphériques et centraux peuvent, soit inhiber soit exagérer les effets d'un stimulus nociceptif. Par conséquent, l'activité somesthésique de base interviendrait dans la douleur en jouant un rôle dans la transmission d'informations continues en rapport avec l'intégrité corporelle (Villanueva et Nathan, 2000; Villanueva, 2001).

### **1.2.3 Mécanismes de contrôle de la nociception**

Au début des années 1970, des recherches ont montré que la stimulation de certaines régions du tronc cérébral chez le rat abolit les réponses aversives à un certain nombre de stimulus nociceptifs (Mayer et coll., 1971; Mayer et Liebeskind, 1974). Ce type de stimulation a été appelé «analgésie produite par stimulation». Les régions spécifiques du tronc cérébral qui peuvent être impliquées sont la SGPA, la substance grise périventriculaire, certains sites du bulbe rachidien tels que les noyaux du raphé («nucleus raphe magnus», NRM) et le bulbe rostro-ventro médian («rostral ventromedial medulla», RVM) (Basbaum et Fields, 1984). Les fibres issues de la SGPA ou du NRM projettent caudalement dans la moelle épinière par la voie du faisceau dorso-latéral (DLF) où elles libèrent de la sérotonine (5-HT) (Figure 7). Les fibres de la SPGA projettent également vers le NMR, le locus coeruleus (au niveau du pont) et des structures voisines (Wei et coll., 1999) qui libèrent de la noradrénaline

(NE) qui, à leur tour, projettent vers la corne dorsale de la moelle épinière via le DLF dans le cas du NRM, ou via le faisceau ventro-latéral (VLF) dans le cas du locus coeruleus (Jones et Gebhart, 1987). Dans la corne dorsale les neurones sérotoninergiques, principalement, et les neurones noradrénergiques inhibent les afférences nociceptives (voir Millan, 2002 pour revue).

Des études montrent que le développement de l'inflammation conduit à une augmentation progressive de la modulation inhibitrice descendante sur l'activité neuronale de la corne dorsale (Schaible et coll., 1991). Il semblerait que le processus nociceptif spinal soit sujet à un contrôle bidirectionnel des structures supra-spinales. L'interaction entre les voies inhibitrices et facilitatrices de la corne dorsale affecte le développement de l'hyperexcitabilité et de l'hyperalgésie. Un déséquilibre de ce système modulateur serait un des mécanismes sous-jacents au passage de la douleur aiguë à la douleur chronique.

- *Le contrôle inhibiteur diffus*

La transmission des messages nociceptifs est modulée par de puissants contrôles dès les premiers relais médullaires, à la fois par des mécanismes segmentaires médullaires et par des systèmes qui mettent en jeu des structures supraspinales (SGPA et NRM) (Figure 7). Si les mécanismes segmentaires peuvent bien être déclenchés par des stimulations issues du métamère correspondant, certains contrôles inhibiteurs descendants sont également déclenchés par la stimulation d'autres parties du corps. En effet, les neurones à convergence de la corne dorsale sont très fortement inhibés lorsque l'on applique une stimulation nociceptive sur une partie du corps différente de leur champ périphérique excitateur. Ce phénomène a été nommé Contrôle Inhibiteur Diffus induit par stimulation Nociceptive (CIDN).

Quelle qu'en soit sa nature, un stimulus nociceptif active des neurones médullaires qui, via les axones du quadrant antérolatéral, vont mettre les CIDN en jeu dans le tronc cérébral. En retour, ces systèmes seront à l'origine d'informations qui descendent dans les faisceaux postéro-latéraux pour déclencher des inhibitions très puissantes dans la corne dorsale de tous les segments médullaires non concernés par le stimulus initial. Les CIDN sont déclenchés spécifiquement par les stimulations nociceptives et par la mise en jeu des fibres périphériques de petit calibre (A $\delta$  et C). Les voies ascendantes et descendantes de la boucle sont localisées respectivement dans le quadrant antérolatéral et dans le faisceau postérolatéral. Les structures cérébrales participant aux CIDN appartiennent à la formation réticulée et sont localisées dans la partie caudale du bulbe (Le Bars et coll., 1995).

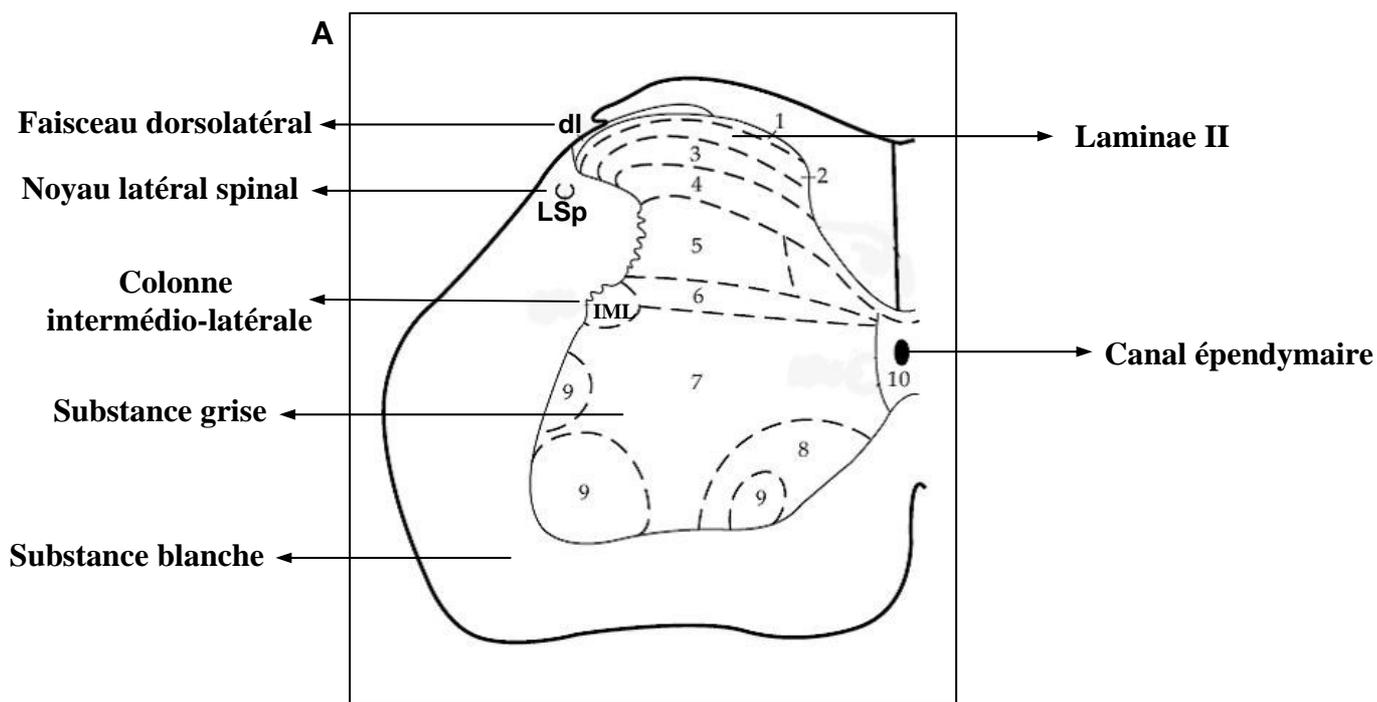
### **1.3 Moelle épinière**

#### **Organisation anatomo-fonctionnelle observée à plusieurs niveaux**

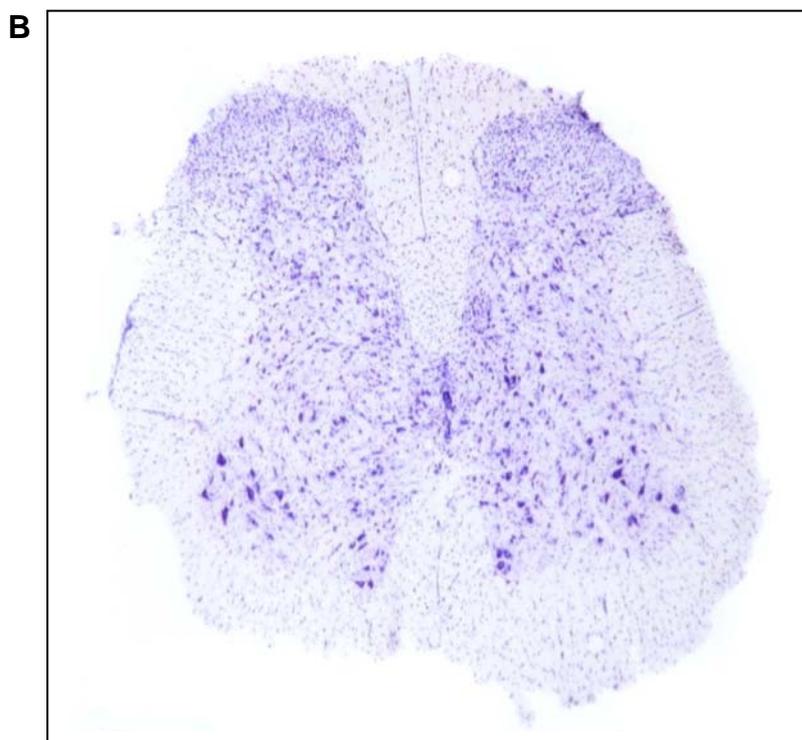
1) La partie externe de la moelle épinière est constituée de substance blanche qui contient les fibres nerveuses ascendantes et descendantes. La partie interne est constituée par la substance grise médullaire avec les cornes dorsales ou postérieures (partie sensitive) et les cornes ventrales ou antérieures (partie motrice) s'étendant dorsolatéralement et ventrolatéralement respectivement vers les zones d'attache des racines dorsales et ventrales. Les segments thoraciques et lombaires supérieurs possèdent une petite corne latérale, située entre les cornes dorsales et ventrales, qui contient les corps cellulaires des neurones sympathiques pré-ganglionnaires (Figure 8A). La substance grise de la moelle épinière peut être divisée, sur une base cytoarchitectonique, en 10 zones, numérotées séquentiellement dans le sens dorsoventral, formant les couches de Rexed (Figure 8A) (Mollander et coll., 1984). Les cinq premières couches correspondent à la corne postérieure, les couches VI-VII à la zone intermédiaire, les couches VIII-IX à la corne antérieure et la couche X à la zone périépendymaire. Les couches I et II sont parfois appelées zone marginale et substance gélatineuse.

2) Dans la substance blanche, les fibres myélinisées de grand diamètre A $\beta$  se divisent en deux contingents en fonction de la taille et de la nature des afférences. Le premier emprunte les cordons postérieurs pour activer le système lemniscal responsable des sensibilités tactiles et proprioceptives. Le second bifurque pour entrer sur plusieurs segments rostraux et caudaux dans la substance grise médullaire et se terminer dans les couches III-V et dans une moindre mesure II et VI. Les fibres myélinisées de petit diamètre A $\delta$  ne projettent que localement vers les couches I, V et dans une moindre mesure la couche II de la corne dorsale. Les fibres C, non myélinisées, après avoir cheminé sur quelques segments dans le tractus de Lissauer, lame située entre la partie postéro-externe de la corne dorsale et la surface extérieure de la moelle épinière, projettent essentiellement vers les couches I et II (Figure 9) lorsqu'elles sont d'origine cutanée mais aussi V-VII et X lorsqu'elles sont d'origine viscérale (Le Bars et Plaghki, 2001).

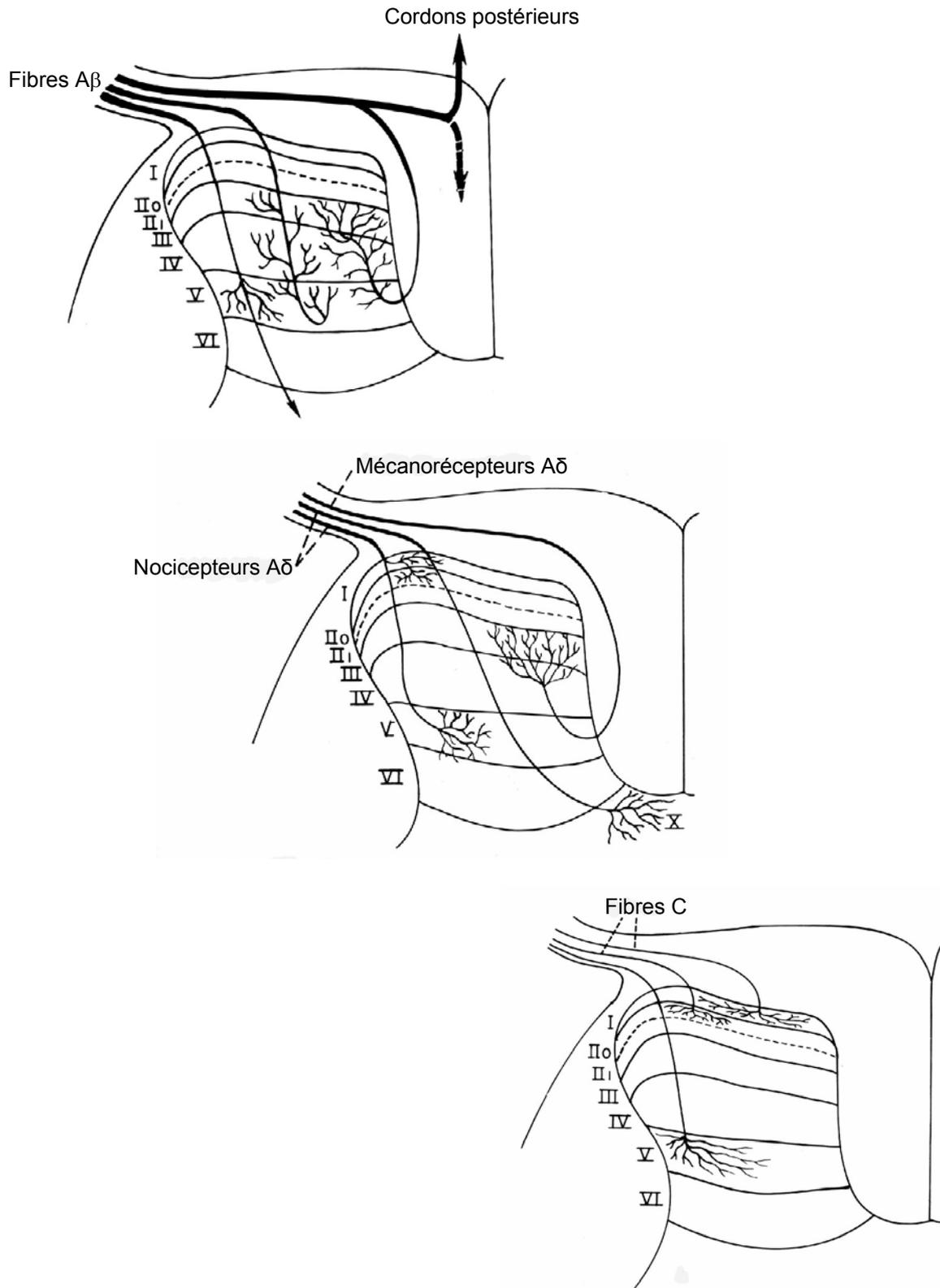
Les fibres afférentes entrant par les racines dorsales se divisent en branches ascendantes et descendantes en fonction de l'origine des afférences primaires (somatotopie). Les afférences cutanées tendent à se terminer dans les couches superficielles de Rexed I et IV, tandis que les afférences proprioceptives projettent essentiellement dans les zones profondes



*D'après Molander and Grant, 1995*



**Figure 8. A)** Schéma d'une coupe de moelle épinière de rat réalisée au niveau L3. **B)** Coupe de moelle épinière réalisée dans la même région et colorée au Crésyl violet.



**Figure 9. Dessins de la route et terminaison des différentes fibres nerveuses Aβ, Aδ et C dans la corne dorsale de la moelle épinière.**

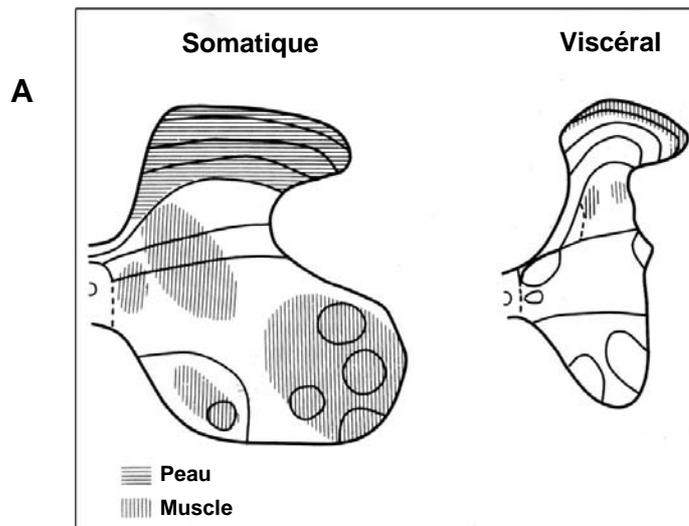
(Figure 10A) (Grant, 1995; Petkó et Antal, 2000). Les afférences viscérales se terminent principalement dans la couche I, la lamina X et le noyau spinal latéral.

La plupart des fibres afférentes primaires nociceptives se terminent dans les couches superficielles de la corne dorsale (laminae I et II), quelques fibres A $\delta$  finissent dans la lamina V, et les fibres C d'origine viscérale finissent dans la laminae V-VII et X, quelques fibres terminent bilatéralement. Bien qu'il n'y ait pas de ségrégation stricte de ces deux populations, les neurones activés par des stimuli nociceptifs, neurones nociceptifs-spécifiques (NS), se trouvent principalement dans les couches superficielles de la corne dorsale, laminae I-II, tandis que les neurones activés par des stimuli nociceptifs et non-nociceptifs, neurones nociceptifs non-spécifiques (NNS) ou neurones à convergence (Le Bars et coll., 1986) sont localisés principalement dans les couches profondes de la moelle épinière, laminae V-VI. Une autre population de neurones de la corne ventrale, laminae VII-VIII, répond aux stimuli nociceptifs de régions très étendues du corps (Willis et Coggeshall, 1991).

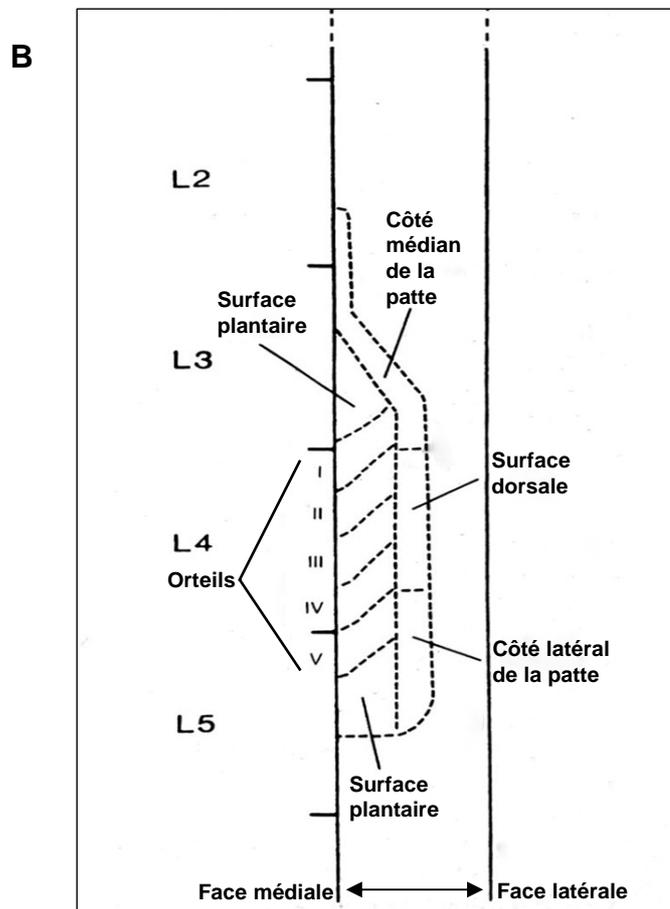
La somatotopie des afférences primaires de la peau glabre des pattes postérieure du rat dans les cornes dorsales est bien établie (Sweet et Woolf, 1985; Molander et Grant, 85, 86; Shortland et Woolf, 1993). Le tiers médian de la corne dorsale, essentiellement la couche II, reçoit les afférences de la surface plantaire et les afférences de l'aire latérale de la partie proximale ou dorsale de la surface cutanée poilue. Les afférences de la peau glabre du rat sont localisées dans le renflement lombaire (L) des segments L3 à L6. La somatotopie montre que les orteils sont représentés en position caudale, de L4 à L5. Le coussinet de la patte projette de L3 à L5, rostralement et caudalement à la projection des orteils. La peau de la région dorsale de la patte projette latéralement aux orteils au niveau du segment L4 (Figure 10B). Il existe cependant un chevauchement des projections des différentes aires de la peau de la patte (Mollander et Grant, 1985; Shortland et Woolf, 1993). Il est à noter que l'organisation somatotopique de la corne dorsale lombaire du rat et du chat est semblable (Woolf, 1987).

La représentation segmentée de la distribution des fibres afférentes cutanées ou dermatomes des nerfs spinaux L3-L5 inclut principalement les tissus de la patte postérieure (Figure 11A, B). Les fibres afférentes, rostrales à L2 ou caudales à L6, innervent les tissus superficiels et profonds du tronc et du périnée (Bajrović et Sketelj, 1998; Takahashi et coll., 2003).

Les thermatomes représentent les surfaces cutanées dont la température est transmise par un seul segment spinal. La température perçue sur les pattes postérieures est principalement transmise aux segments L2-L5, particulièrement à L4 et L5. Il semble que les thermatomes ne

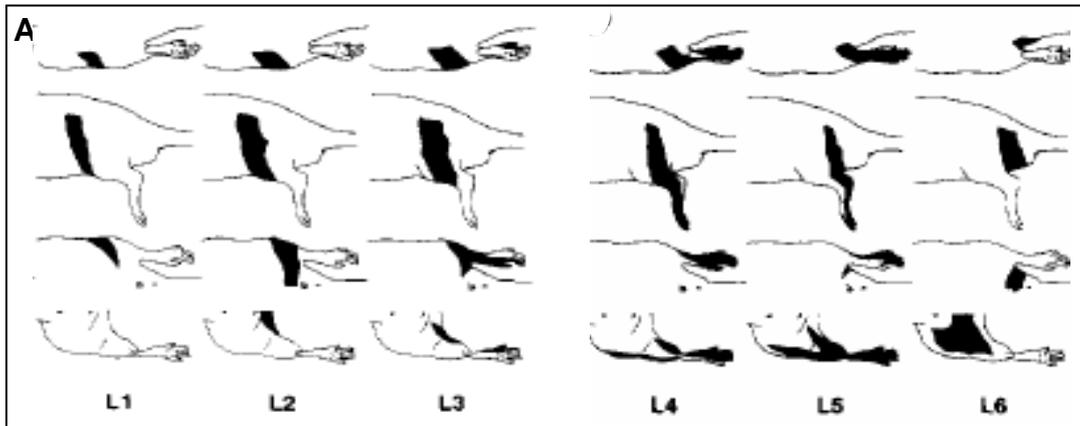


*D'après, Grant G. 1995*

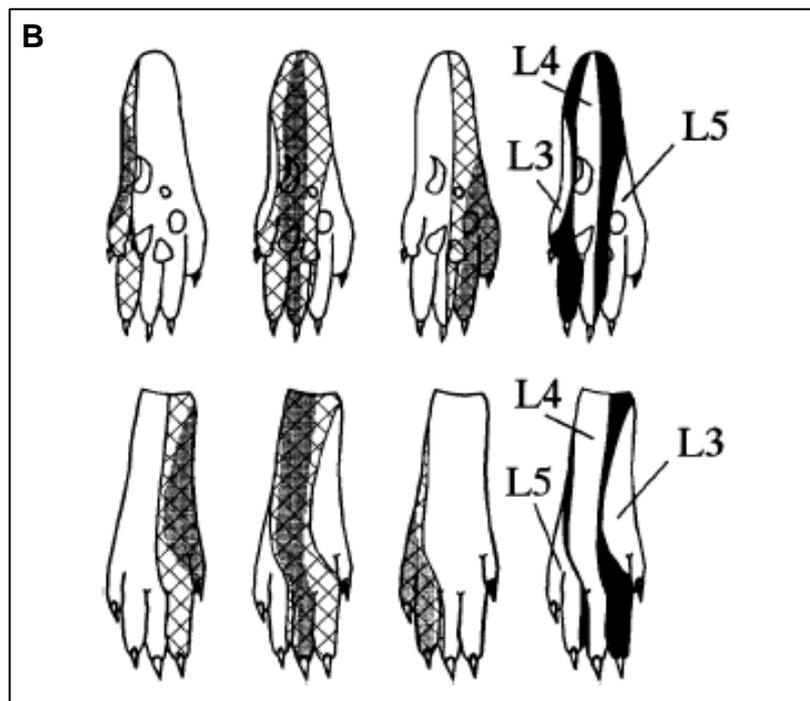


*D'après, Mollander et Grant, 1985*

**Figure 10. A)** Schéma d'une section transversale de la moelle épinière de rat en montrant les sites de terminaison des fibres afférentes cutanées et musculaires (à gauche) et viscérales (à droite). **B)** Schéma des projections de la peau de la patte arrière du rat dans la lamina II de la corne dorsale au niveau lombaire de la moelle épinière.



*D'après Takahashi et Nakajima 1996*



*D'après Bajrovic et Sketel, 1998*

**Figure 11. A)** Dermatomes du membre inférieur du rat, correspondant aux niveaux spinaux lombaire 1-6. **B)** Dermatomes nociceptifs de la patte de rat pour les niveaux spinaux lombaires 3-5.

coïncident pas avec les dermatomes sensoriels dans les segments lombaires du rat (Takahashi et coll., 2002).

Les neurones nociceptifs sont excitateurs et utilisent comme neurotransmetteurs l'acide glutamique et la substance P. Dans les couches superficielles, des interactions complexes se forment avec d'autres fibres afférentes primaires, des interneurons et des fibres descendantes d'origine supraspinale. Ces interactions contrôlent l'information nociceptive transmise aux neurones des faisceaux ascendants spinothalamiques et spinoréticulaires distribués dans toute la corne dorsale. Certains interneurons de la corne dorsale libèrent de l'enképhaline et établissent des contacts présynaptiques avec les terminaisons des neurones afférents primaires qui possèdent des récepteurs des opiacés (Eckert et coll., 2003). L'occupation de ces récepteurs réduit la libération de substance P. Les propriétés analgésiques des opiacés tels que la morphine résultent en partie de leur action à ce site.

#### **1.4 La Douleur chez l'animal**

Une part importante des données scientifiques sur la douleur est obtenue grâce à l'expérimentation animale. Il est donc important de décrire les concepts de la douleur chez l'animal.

D'après l'école vétérinaire d'Edinburgh, la douleur chez l'animal est une expérience sensorielle aversive qui déclenche des actions motrices protectrices telles qu'une évasion et peut modifier les traits du comportement spécifique de l'espèce, incluant le comportement social.

Molony (1997) définit la douleur chez l'animal comme une expérience sensorielle aversive, qui évoque dans la conscience de l'animal, le danger ou la menace de l'intégrité de ses tissus. Les changements de comportement de l'animal ont pour but d'éviter ou de réduire la lésion, en diminuant la probabilité de son apparition et en promouvant la guérison.

La reconnaissance de la douleur et de la détresse chez l'animal est basée sur l'observation des réponses comportementales et des paramètres physiologiques.

Signes physiologiques:

- Dilatation des pupilles
- Changements de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque
- Augmentation de la fréquence respiratoire

- Pilo-érection
- Changements de la température corporelle
- Sueur, augmentation de la diurèse et défécations

Signes comportementaux généralement associés à la douleur et la souffrance:

- L'animal se tient sur ses gardes, protège la région douloureuse, s'éloigne, devient agressif
- Vocalisations (cris quand l'animal bouge ou quand on le touche)
- Expression faciale (l'animal maintient les paupières partiellement fermées, et émet des « larmes rouges »)
- Mutilation (l'animal se lèche, se mord, se griffe, se secoue)
- Agitation (l'animal se couche et se lève)
- Prostration (durée inhabituelle d'immobilité)
- Déambulation (l'animal manifeste un retrait de la patte si celle-ci est douloureuse, il présente des difficultés pour marcher et pour se lever, il évite de se déplacer)
- Position anormale (tête dirigée vers le bas, repliée vers l'abdomen)

En cas de douleur chronique, les signes comportementaux précédents s'accompagnent d'une diminution de l'appétit conduisant à une perte de poids, d'une diminution du toilettage, d'une réduction de l'activité locomotrice et d'exploration, d'une perte du sommeil, d'une irritabilité et d'une diminution du comportement sexuel et des interactions sociales (Soma, 1987; Scharmann, 1999; Carstens et Moberg, 2000).

Quelques échelles ont été publiées pour évaluer l'intensité de la douleur chez l'animal de façon graduée et objective. C'est le cas de l'Echelle Suisse non-invasive (Swiss Academy, 1997) qui propose des niveaux d'intensité qui vont de léger à modéré et sévère. L'échelle la plus acceptée est celle de Morton and Griffiths (1985). Les auteurs ont proposé un système clinique de notes composé de plusieurs variables indépendantes: masse, apparence, signes cliniques mesurables (par exemple, la fréquence respiratoire), comportement spontanée et réponses comportementales à des stimulus externes. Chaque catégorie correspond à un niveau qui va de 0 (normal ou léger) à 3 (sévere), le score final donne une évaluation de la condition de l'animal.

En plus de l'observation des réponses comportementales spontanées et des paramètres physiologiques, différents tests ont été mis au point pour mesurer la réponse de l'animal lors

de stimulations nociceptives mécaniques ou thermiques. Les paramètres mesurés peuvent être le seuil d'apparition d'une réponse ou bien, l'intensité ou la rapidité de la réponse chez l'animal présentant différents types de douleurs, inflammatoire ou neuropathique, locale ou générale (voir tableau 3).

Les deux tests du «Tail-flick» (D'Amour et Smith, 1941) et du «Hot-plate» (Woolfe et MacDonald, 1944) sont employés pour évaluer le temps de latence de la réponse (respectivement mouvement de la queue et évitement de la plaque chaude) à un stimulus nociceptif thermique calibré. Cependant ces deux tests présentent plusieurs inconvénients, dont l'impossibilité de différencier les deux pattes. Le Plantar® test (Hargreaves et coll., 1988) est une méthode plus récente qui évite cet inconvénient en employant un faisceau focalisé de chaleur. Elle permet ainsi d'utiliser la patte controlatérale comme contrôle. En outre, la détection automatique du temps de latence améliore la précision de la méthode.

Le réflexe de retrait de la patte est une des réponses les plus utilisées chez les animaux pour mesurer le seuil nociceptif. Celui-ci résulte d'un réflexe polysynaptique dans lequel interviennent un ou plusieurs interneurons interposés entre les neurones afférents et efférents. Les fibres afférentes primaires activent les interneurons dans la substance grise médullaire qui stimulent à leur tour le motoneurone  $\alpha$  innervant les muscles fléchisseurs du membre. La flexion d'un membre sur plusieurs articulations exige l'action coordonnée de plus d'un segment spinal, obtenue par les collatérales des neurones afférents primaires et des interneurons.

Le réflexe de retrait de la patte a été beaucoup utilisé comme modèle pour étudier la douleur et les mécanismes associés. Chez le chat et chez le rat, ce type de réflexe nociceptif a une organisation modulaire, dont chaque module contrôle un seul ou peu de muscles synergiques ayant une action similaire et un champ réceptif caractéristique qui est en relation avec le mouvement provoqué par la réponse du muscle (Schouenborg et Kalliomäki, 1990; Schouenborg et Weng, 1994; Schouenborg, 2002). Ainsi le mouvement typique du retrait dépend de l'action concertée d'un nombre fini de modules réflexes. Les interneurons qui peuvent encoder les champs réceptifs de l'organisation modulaire ont été identifiés dans les couches profondes des segments spinaux L4-L5 (Schouenborg et coll., 1995).

**Tableau 3. Méthodes utilisées pour évaluer la douleur chez l'animal**

Test	Type de stimulation	Mesure de la réponse
Tail-flick	thermique	Reflexes spinaux
Reflex de retraite de la patte	thermique, électrique ou mécanique	
Reflexe d'ouverture de la mâchoire	électrique	
Hot plate	thermique	Comportement organisé non-appris (processus supra-spinal)
Réponse de torsion	chimique	
Réponse de vocalisation	électrique et mécanique	
Formaline	Inflammation locale	Douleur persistante
Carragénine		
Adjuvant de Freund		
Zymosan		
Polyarthrites	Inflammation générale	
Déafférentation complète (neurone)	Douleur neuropathique	
Déafférentation partielle (mononeuropathie)		
Diabète induit par streptozotocine		

*Modifiée d'après Dubner, 1994*

Contrairement aux tests thermiques qui sont basés sur la mesure du temps de latence de la réponse à une température donnée, les tests mécaniques sont basés sur l'évaluation du seuil nociceptif à une augmentation graduée du stimulus. Les dispositifs utilisés pour le test de Randall-Selitto (1957) ou le test modifié de Randall-Selitto (analgesimètre) appliquent une pression progressive connue sur la patte placée entre une surface plate et un cône en plastique. Le retrait de la patte indique le seuil de pression qui n'est plus supportée par l'animal. L'inconvénient principal de cette technique est la nécessité de maintenir l'animal dans une position verticale. Cette contrainte, qui peut interférer avec l'évaluation de la douleur, est évitée par l'entraînement des animaux à la manipulation (Taiwo et coll., 1989). L'utilisation des filaments de Von Frey représente une autre manière d'évaluer l'hyperalgésie mécanique (Chaplan et coll., 1994). Un filament souple calibré est appliqué sur la patte à travers le fond d'une cage en grillage sans maintenir l'animal. Cette méthode, utile pour évaluer une allodynie, est mal adaptée à la mesure des changements légers de sensibilité mécanique. En effet, la précision de la mesure peut être affectée par l'échelle logarithmique de la force appliquée par les différents filaments. D'autre part, la force réellement appliquée peut être affectée par une poussée exercée par l'animal sur le filament.

Des études récentes utilisent une pince calibrée de fabrication propre à chaque laboratoire qui permet d'appliquer manuellement une pression progressive à l'extrémité des branches de la pince appliquées sur la patte du rat jusqu'au retrait de cette dernière ou jusqu'à la vocalisation de l'animal (Yu et coll., 2002; Skyba et coll., 2005). Cette méthode simple nécessite cependant une contention de l'animal mais moins contraignante que celle de la méthode de Randall et Selitto.

Il est important de noter que toutes ces techniques doivent répondre le mieux possible aux critères de spécificité, sensibilité, validité, fiabilité et reproductibilité qu'il convient de respecter pour mesurer la douleur (Le Bars et coll., 2001).

## **2. INFLAMMATION ET DOULEUR**

L'inflammation est une réaction de défense des tissus contre des agents le plus souvent exogènes (bactéries), mais parfois endogènes (processus dégénératifs). L'inflammation fait intervenir des cellules, des vaisseaux, la matrice extracellulaire et de nombreux médiateurs chimiques qui peuvent être pro ou anti-inflammatoires et qui peuvent modifier ou entretenir la réponse inflammatoire (Rousselet et coll., 2005; **Figure 12**).

### *Inflammation aiguë*

C'est la réponse immédiate à un agent agresseur. Elle est de courte durée (quelques jours ou semaines), d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses. Les inflammations aiguës peuvent guérir spontanément ou non, mais dans les deux cas, elles peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante.

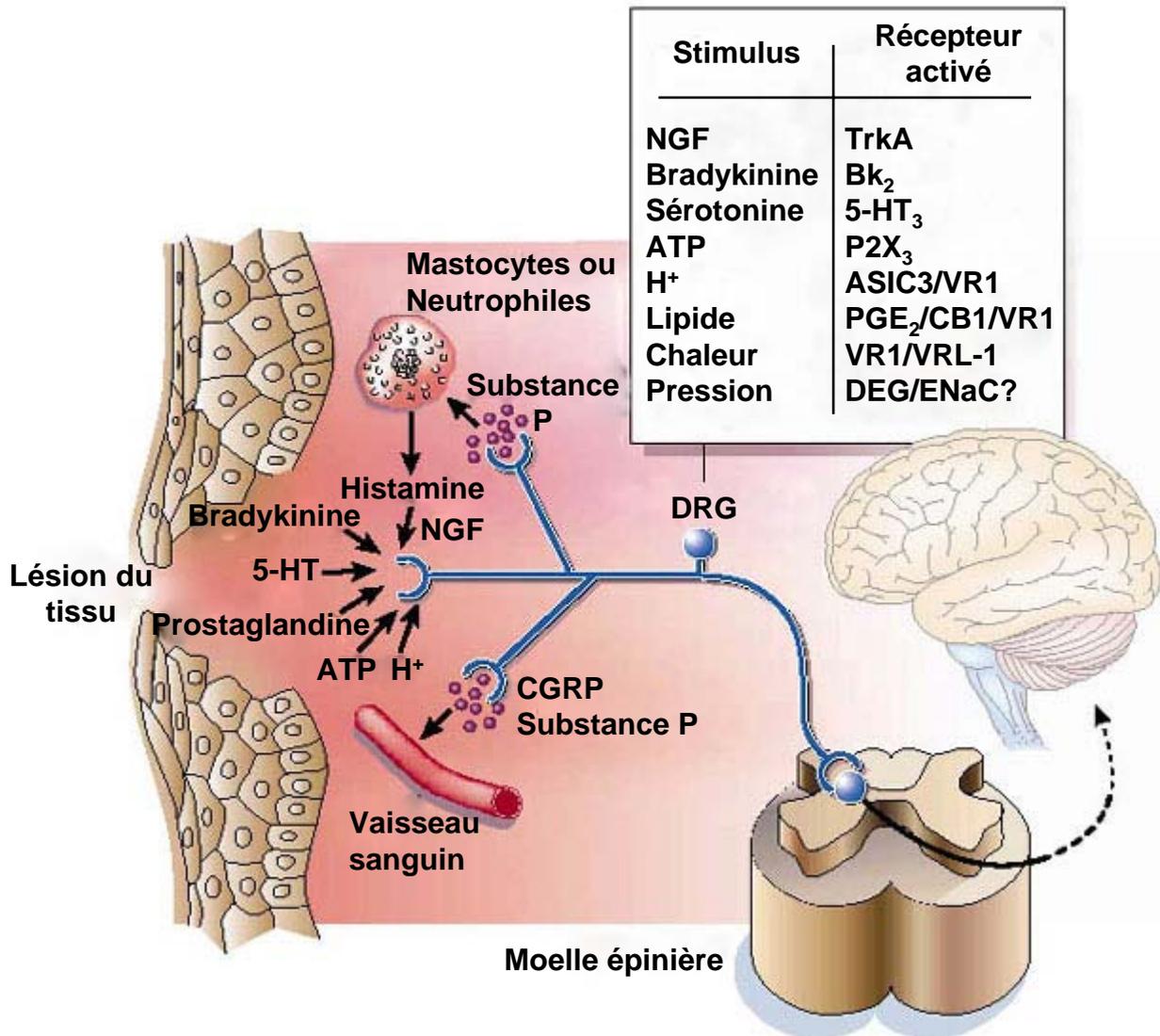
### *Inflammation chronique*

C'est une inflammation qui n'a aucune tendance à la guérison spontanée et qui évolue en persistant ou en s'aggravant pendant plusieurs mois ou plusieurs années.

### **2.1 Réaction inflammatoire**

Le déroulement de la réaction inflammatoire comporte initialement une phase locale ou vasculaire immédiate mettant en jeu des phénomènes cellulaires, humoraux et vasculaires. Dans certains cas, après mise en jeu de ces phénomènes, il existe une phase générale ou cellulaire comportant des perturbations protéiques, hormonales et hématologiques. L'ensemble de ces phénomènes contribue à la phase terminale de réparation et de cicatrisation. Ce type d'inflammation est responsable de plusieurs états de douleur persistante tels que l'arthrite, le mal de dos et la douleur temporo-mandibulaire.

La phase vasculaire constitue la tétrade classique de Celsus (douleur, rougeur, chaleur et tuméfaction) qui correspond à l'installation de deux phénomènes, la congestion et l'œdème. Cette réaction vasculaire est immédiate; en quelques secondes apparaît la rougeur associée à la douleur qui est liée à la congestion. Il s'agit d'une modification du calibre vasculaire qui apparaît très rapidement, après une brève vasoconstriction, et consiste en une vasodilatation



*D'après Julius et Basbaum, 2001*

**Figure 12.** « La soupe inflammatoire. » quelques médiateurs de l'inflammation libérés dans la zone de la lésion incluant: les peptides (bradykinine), lipides (prostaglandines), neurotransmetteurs (sérotonine) et neurotrophines (NGF).

artériolaire puis capillaire dans la zone atteinte. La congestion est déclenchée par un mécanisme nerveux et par l'action de médiateurs chimiques.

L'œdème inflammatoire est dû au passage dans le tissu conjonctif interstitiel ou les cavités séreuses d'un exsudat fait d'eau et de protéines plasmatiques. Sa traduction clinique est un gonflement des tissus qui, en comprimant des terminaisons nerveuses, contribue à la douleur, également produite par des médiateurs chimiques. Ainsi l'œdème inflammatoire résulte d'une augmentation de la pression hydrostatique due à la vasodilatation et surtout d'une augmentation de la perméabilité de la paroi des petits vaisseaux sous l'effet de médiateurs chimiques, dont l'histamine.

Un troisième phénomène de la phase vasculaire est la migration des leucocytes hors de la microcirculation et leur accumulation dans le foyer lésionnel. Elle intéresse d'abord les polynucléaires, pendant les 6 à 24 premières heures, puis un peu plus tard en 24 à 48 heures les monocytes et les lymphocytes.

La myéloperoxydase (MPO) est une enzyme localisée dans les granules azurophiles des polynucléaires neutrophiles des mammifères. Sa fonction est de tuer les bactéries que les neutrophiles ont phagocytées. Cette enzyme est utilisée comme marqueur de l'inflammation cutanée (Bradley et coll., 1982; Trush et coll., 1994; Bhatia et coll., 2005).

## **2.2 Médiateurs de l'inflammation**

On peut distinguer deux types de substances médiatrices. Les unes sensibilisent les nocicepteurs. C'est le cas des prostaglandines et des leucotriènes (LT) B<sub>4</sub>, métabolites de l'acide arachidonique qui lui-même provient des phospholipides membranaires libérés par la lésion tissulaire. Les autres activent ou sensibilisent les nocicepteurs. C'est le cas de la bradykinine plasmatique, la sérotonine plaquettaire et de l'histamine qui, libérée par les mastocytes (Nathan, 2002; Craig et Sorokin, 2005), contribue à la vasodilatation et qui est responsable du prurit. D'autres molécules sont impliquées dans la genèse ou l'entretien des processus inflammatoires (Figure 12). Les cytokines, les interleukines (IL) et le facteur de nécrose tumorale («tumor necrosis factor» TNF) sont produits par les cellules du système immunitaire tandis que le facteur de croissance neuronale («nerve growth factor», NGF) est produit par les fibroblastes. Ce dernier favoriserait l'excitabilité des nocicepteurs en se fixant sur son récepteur tyrosine-kinase (TrkA). Un certain nombre de tachykinines dont la Substance P (SP) et le peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP) sont libérées par les

terminaisons libres et stimulent les nocicepteurs (Dray, 1995; Lawrence et coll., 2002). La SP active les macrophages, les monocytes, les lymphocytes et libère l'oxyde nitrique (NO) à partir des cellules endothéliales.

Après inflammation la surexpression des récepteurs vanilloïdes 1 (VR1) et de canaux spécifiques du sodium («specific sodium channel», SNS) peut contribuer à une augmentation de la sensibilité aux médiateurs inflammatoires. Les neurones des fibres A expriment la SP et le facteur neurotrophique dérivé du cerveau («brain-derived neurotrophic factor», BDNF) lors de l'inflammation, et contribuent à induire une sensibilisation centrale dans le tissu lésé (Ma et Woolf, 1996).

L'inflammation peut induire des changements de transcription dans les neurones de la corne dorsale par l'activation de la cascade des protéines MAP Kinases («Mitogen-Activated Protein Kinases», MAPK) et de la protéine de liaison à l'élément répondant à l'AMPc («cyclic AMP response element binding», CREB). Ces cascades peuvent modifier l'expression de la cyclo-oxygénase 2 (COX2, Hay et Belleruche, 1997), des récepteurs du neuropeptide-K1 (NK1), TrkB, du GABA, ainsi que la transmission synaptique impliquant la dynorphine, l'énképhaline, et au GABA (Hay et Belleruche, 1997; Furst, 1999).

La douleur inflammatoire peut être initiée par une lésion tissulaire et se caractérise par une hypersensibilité du site de lésion et du tissu sain adjacent. La douleur peut être ressentie spontanément, et des stimulus qui normalement ne produisent pas de douleur peuvent en produire. Ce phénomène est appelé allodynie. D'autre part, les stimuli nociceptifs hors de toute inflammation, évoquent une douleur plus grande et prolongée dite hyperalgésie lors de l'inflammation (Woolf et Mannion, 1999). Les récepteurs du glutamate de type N-méthyl-D-aspartate (NMDA) jouent un rôle critique dans la production de l'hyperalgésie. La stimulation des fibres C produit la libération de glutamate et d'aspartate, lesquels stimulent les récepteurs NMDA de neurones de convergence caractérisés par leur grand domaine de fréquence d'impulsions («wide dynamic range neurons» WDR. Covington, 2000) et activés par de nombreuses informations sensorielles.

On distingue une hyperalgésie primaire et une hyperalgésie secondaire. L'hyperalgésie primaire se manifeste à l'endroit même où la stimulation nociceptive initiale a été appliquée. Elle peut s'expliquer par un mécanisme périphérique dû à la sensibilisation des récepteurs lors d'une stimulation nociceptive intense et répétitive ou lors d'un phénomène inflammatoire, et par un mécanisme central lié à une insuffisance fonctionnelle des grosses fibres myélinisées A.

L'hyperalgésie secondaire se manifeste autour et parfois au-delà de la zone de l'hyperalgésie primaire, traduisant l'augmentation des champs récepteurs excitateurs. Elle s'explique principalement par la sensibilisation des neurones nociceptifs spinaux, secondairement à une hyperactivité des nocicepteurs ou à une diminution de l'activité des interneurons inhibiteurs.

### **2.3 Etude expérimentale de la douleur inflammatoire : le modèle carragénine**

Il existe plusieurs modèles de douleur inflammatoire, utilisant différents agents tels que la formaline (Lam et coll., 1996), la carragénine (Honoré et coll., 2000), l'adjuvant de Freund (Goff et coll., 1998) et le zymosan (Meller et Gebhart, 1997).

La carragénine est un polysaccharide sulfaté, présent dans plusieurs espèces d'algues rouges (*Irish moss* ou *Chondrus crispus*; **Figure 13**), existant sous trois types: Kappa ( $\kappa$ ), Iota ( $\iota$ ) et Lambda ( $\lambda$ ). Les deux premiers types forment des gels utilisés principalement comme agents stabilisateurs dans les aliments tels que le fromage, la crème, le chocolat et la glace. La carragénine  $\lambda$  est proinflammatoire, elle provoque un œdème et elle est souvent utilisée dans les études pharmacologiques pour tester les agents anti-inflammatoires (Winter et Coll., 1962). L'effet proinflammatoire de la carragénine est caractérisé par une augmentation diphasique de la perméabilité des petits vaisseaux sanguins. La première phase, qui commence immédiatement après l'injection de carragénine, est de durée brève et la fuite des molécules de l'inflammation représentées successivement par l'histamine, la sérotonine, les quinines et les prostaglandines, se produit à partir des veinules et des capillaires autour du site de l'injection (Di Rosa et coll., 1971; Di Rosa, 1972). Cette réponse est suivie d'une deuxième phase caractérisée par l'augmentation de la perméabilité vasculaire et par une migration massive de leucocytes qui commence environ 90 min après l'injection de carragénine et dure plusieurs heures (Hurley et Willoughby, 1973).

Depuis le travail de Winter et col. (1962), beaucoup d'études ont démontré que les effets de la carragénine apparaissent rapidement après l'injection et atteignent une valeur maximale 4 à 6 h plus tard (Di Rosa, 1972), selon la dose. Pour cette raison, la carragénine a été habituellement utilisée pour étudier l'inflammation aiguë (Xu et coll., 1995; Gentili et coll., 1999; Omote et coll., 2001). Cependant plusieurs études indiquent que l'œdème et l'hyperalgésie produits par la carragénine peuvent durer plusieurs jours (Suzuki et coll., 1996; Kissin et coll., 1998; López-Avila et coll., 2004).



**Figure 13.** Algues rouges *Irish moss* ou *Chondrus crispus*, d'où est extraite la carragénine

Nous avons choisi la carragénine comme agent d'inflammation pour les raisons suivantes:

1. Elle provoque rapidement une hyperalgésie (dans les premières minutes après l'injection; Hargreaves et coll., 1988).
2. L'hyperalgésie produite est relativement stable pendant une durée qui s'étend jusqu'à 7 jours. (Suzuki et coll., 1996; Kissin et coll., 1998; Lopez-Avila et coll., 2004).
3. Il existe de nombreuses données sur les mécanismes intervenant dans le développement de l'hyperalgésie (Meller et coll., 1994a; Osborne et Coderre, 1999 ; Omote et coll., 2001).

Le zymosan, polysaccharide produit par la paroi cellulaire du *Saccharomyces cerevisiae* (levure du boulanger) a été utilisé accessoirement dans notre travail pour induire l'inflammation dans une étude sur l'induction de la nNOS. Cet agent présente des caractéristiques inflammatoires proches de celles de la carragénine (Meller et coll., 1994b; Meller et Gebhart, 1997; Randich et coll., 1997; Guhring et coll., 2001).

### 3. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION DE LA FAMILLE FOS

Des facteurs de transcription, en particulier ceux de la famille FOS sont exprimés lors d'une douleur inflammatoire. Leur expression suggère qu'ils interviennent dans la modification de l'activité des circuits neuronaux impliqués dans la douleur. De plus, en neurosciences, ces protéines sont souvent utilisées comme index d'activation des cellules nerveuses, notamment pour établir des cartographies fonctionnelles.

L'ADN, support de l'information génétique, est organisé en brins de chromatine formant des chromosomes. Il est stocké dans le noyau des cellules, sous forme plus ou moins compacte, réglant l'accessibilité des gènes aux molécules utilisant les informations qu'ils contiennent. Les facteurs de transcription sont des protéines pouvant se lier à l'ADN afin d'initier ou de réprimer l'expression de gènes cibles. Pour certains facteurs de transcription, leur synthèse et/ou activation peut être associée à la mise en jeu de voies de transduction intracellulaires et donc dépendre des informations arrivant à la cellule. Cette propriété en fait des acteurs majeurs des mécanismes de plasticité, tels que ceux qui interviennent pour déterminer les bases moléculaires de la mémoire (Kaczmarek, 1992). Découvertes comme étant les homologues eucaryotes de produits d'oncogènes viraux lors d'études de cancers associés à des virus (Van Beveren et coll., 1983), les protéines de la famille Fos et Jun forment la grande unité fonctionnelle des protéines AP-1 («activating protein-1»). Elles sont synthétisées à partir de 7 gènes dont 3 (*jun B*, *c-jun* et *jun D*) codent les protéines Jun et 4 (*c-fos*, *fosB*, *fra-1* et *fra-2*) codent les protéines Fos.

#### 3.1 Le facteur de transcription c-FOS

Le gène *c-fos* constitue un des gènes de réponse précoce, c'est-à-dire qu'il apparaît parmi les premiers lorsque la cellule passe de l'état quiescent  $G_0$  à l'état préparatoire à la division cellulaire  $G_1$ . La protéine Fos comprenant 380 acides aminés, est localisée dans le noyau et présente une demi-vie très courte (30 minutes). Elle ne peut se fixer seule à l'ADN et doit se lier avec une protéine de 39 kDa codée par le gène *c-jun* avec laquelle elle forme des dimères qui reconnaissent la séquence TGACTCA. La protéine Fos est incapable de se dimériser. La formation du complexe transcriptionnel AP-1 a une activité d'induction de la transcription

pour la plupart des gènes de l'organisme, non seulement ceux de la division cellulaire mais encore ceux impliqués dans la différenciation. La fixation du dimère Fos–Jun introduit une nouvelle courbure de la molécule d'ADN favorisant l'activation de la transcription du gène. La phosphorylation de Jun et de Fos sur des résidus sérine et thréonine par des kinases (cdk1) module leur activité transcriptionnelle.

Le promoteur du gène *c-fos* possède plusieurs éléments de réponse conduisant à son induction. à savoir trois sites de liaisons du facteur CREB phosphorylé, un élément de réponse au sérum (SRE) qui lie à la fois le SRF («serum response factor») et le complexe ternaire du facteur Elk-1 et un élément inductible par SIS (SIE) qui lie les protéines STAT («signal transducers and activators of transcription»). De ce fait, tous les stimuli qui activent les voies de l'AMPc, du Ca<sup>2+</sup>, de la protéine kinase C, des MAP kinases ou de Jak/STAT produisent une induction rapide et de forte amplitude du gène *c-fos*. Cette expression est maximale au bout de 1h30 et disparaît totalement en 6h. Le niveau basal de l'ARNm, ainsi que celui de la protéine c-Fos est quasiment indétectable dans la plupart des cellules. Cette propriété fait de c-Fos le marqueur d'activation neuronale le plus couramment utilisé pour mettre en évidence une activation trans-synaptique dans les études de neuroanatomie fonctionnelle.

Depuis le rapport réalisé par Hunt et col. (1987), plusieurs études ont démontré la présence de neurones immunoréactifs à c-Fos dans la moelle épinière lors d'une stimulation nociceptive aiguë (Bullit, 1990), d'une inflammation périphérique (Draisci et Iadarola, 1989) d'une stimulation thermique nociceptive (Tolle et coll., 1990) ou d'une inflammation induite par la carragénine (Buritova et coll., 1996; 1997; Jergová et coll., 2002; Le Guen et coll., 2003). Le nombre de neurones immunoréactifs à c-Fos est proportionnel à l'intensité de la stimulation ou du comportement indicateur de douleur (Presley et coll., 1990) Ils sont localisés dans les couches I, II et V de la corne dorsale, où ont été identifiés la plupart des neurones nociceptifs (Le Bars et Willer, 2004). En conséquence, le marquage de c-Fos a été utilisé comme marqueur relatif de l'activité neuronale nociceptive dans la moelle épinière (Harris, 1998). Bien qu'il semble que l'expression de c-Fos contribue à la sensibilisation de neurones nociceptifs spinaux, ce facteur est également impliqué dans l'inhibition de la nociception dans la moelle épinière en promouvant l'expression de la dynorphine (Noguchi et col. 1991; Hunter et coll., 1995).

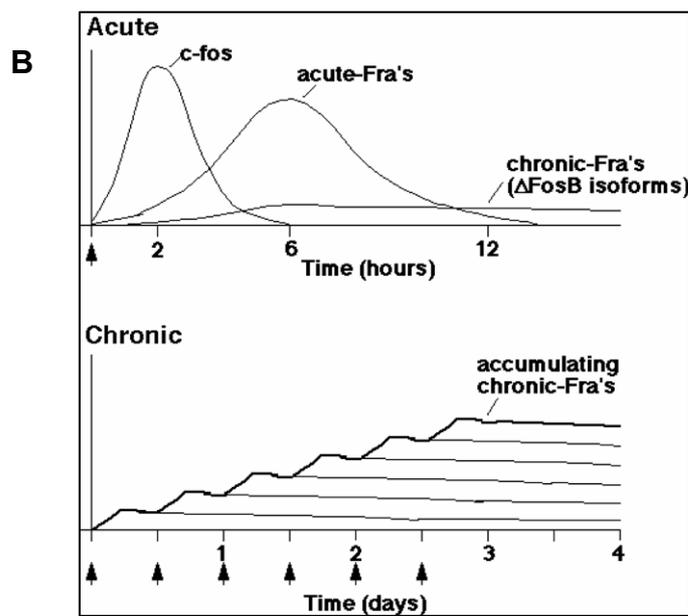
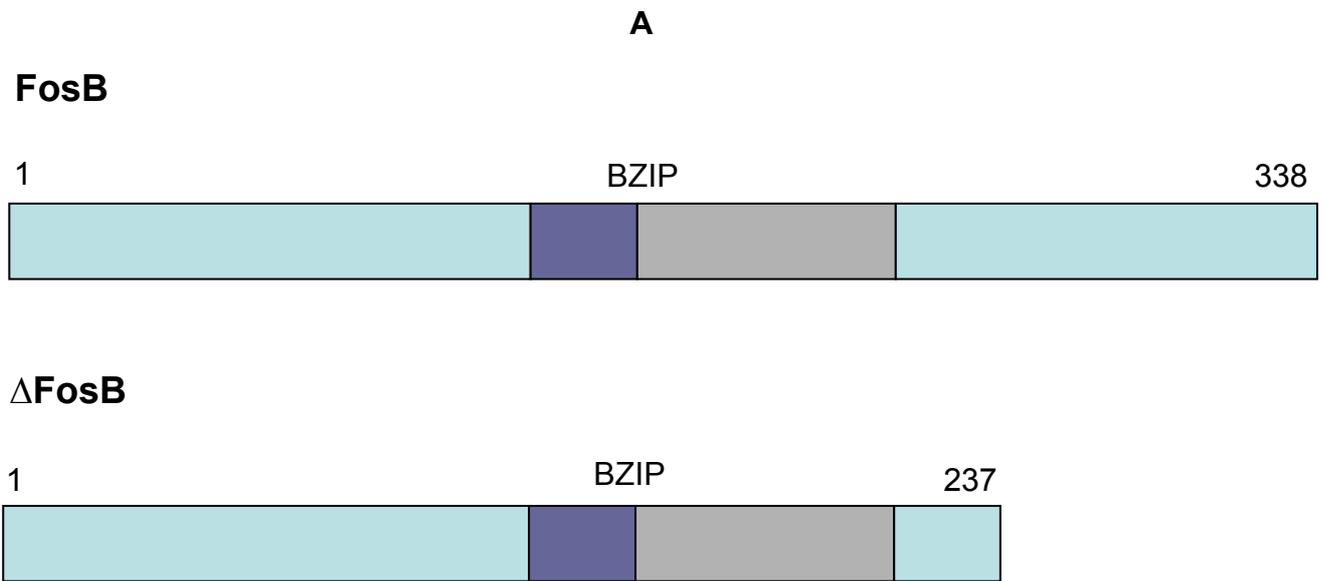
### 3.2 Les facteurs de transcription FOSB et $\Delta$ FOSB

En 1989, Zerial et collaborateurs ont isolé le gène *fosB*, troisième membre de la famille Fos, et son produit d'expression à partir de cellules murines 3T3. La protéine FosB composée de 334 acides aminés a un poids moléculaire de 45 kDa. La structure de son site de liaison est plus proche du domaine de liaison à l'ADN de c-Fos que de Fra-1. Dans le génome murin, le gène *fosB* est organisé en 4 exons et se localise dans la partie distale de la bande A du chromosome 7. FosB et c-Fos sont de puissants répresseurs des promoteurs de *fosB* et *c-fos*. FosB, contrairement à c-Fos n'est pas capable de promouvoir l'activation de la transcription du récepteur des glucocorticoïdes (Lucibello et coll., 1990). La demi-vie de la transcription de *fosB* est seulement de 10 à 15 min (Lazo et coll., 1992). De hauts niveaux d'ARNm sont trouvés dans le cortex cérébral et dans la corne dorsale de la moelle épinière au cours du développement de la souris et disparaissent au-delà du jour E18 (Redemann-Fibi et coll., 1991).

L'expression de FosB dans la moelle épinière est absente hors de toute stimulation nociceptive. Elle apparaît seulement 2 h après stimulation et atteint une valeur maximale 4 à 8h plus tard, avant de décliner après 24 h (Herdegen et coll., 1991).

Au début des années 1990, 2 ans après l'isolation de la protéine FosB à partir d'un ADNc 3T3 murin, une nouvelle forme de protéine FosB a été découverte. Cette protéine appelée  $\Delta$ FosB résulte d'un épissage alternatif de l'ARNm de FosB (Figure 14A, Nakabeppu et Nathans, 1991). La protéine  $\Delta$ FosB existe en fait sous différentes formes (33 kDa et 35-37 kDa) qui se caractérisent par de longues demi-vies. Contrairement aux autres protéines de la famille Fos, ces isoformes de  $\Delta$ FosB peuvent s'accumuler durant de longues périodes du fait de leur grande stabilité (Hope et coll., 1994a,b ; Nestler et coll., 2001, Figure 14B).

Les gènes qui codent les facteurs de transcription de la famille Fos peuvent être induits très rapidement en réponse à divers types de stimulus tels que la stimulation électrique, des perturbations physiologiques, le stress et les drogues psychotropes (Sheng et Greenberg, 1990; Hughes et Dragunow, 1995). Cette induction est habituellement passagère mais différents décours temporels ont été observés selon la protéine Fos considérée. Ainsi, il a été montré que les versions tronquées de FosB, en particulier  $\Delta$ FosB (Chen et coll., 1997; Hiroi et coll., 1997), caractérisée par une longue demi-vie s'accumule de manière région-spécifique



**Figure 14. A)** Structure de FosB et de  $\Delta$ FosB.  
**B)** Expression des différents types de Fos au cours du temps.

dans le cerveau, en réponse à de nombreuses stimulations chroniques (Nestler et coll., 2001; McClung et coll., 2004).

### **3.3 Plasticité Neuronale et douleur**

Face à des changements de l'environnement, l'organisme développe des stratégies adaptatives pouvant conduire à des modifications du système sensoriel. Cette adaptation fonctionnelle implique le plus souvent une plasticité neuronale s'exprimant par la reconfiguration dynamique des réseaux neuronaux correspondant. Ainsi la plasticité neuronale est impliquée dans les phénomènes de douleur. Dans l'inflammation, la grande activité des nocicepteurs périphériques induit des changements durables qui contribuent au développement de l'hyperalgésie et de l'allodynie (Woolf et Costigan, 1999). Ces changements concernent des processus tels que la sensibilité accrue aux stimuli de douleur, l'expansion du secteur du champ réceptif, le recrutement de nouveaux nocicepteurs dans les champs réceptifs, l'augmentation de l'excitabilité des neurones spinaux et le déclenchement de la potentialisation soutenue des réponses neuronales (Koltzenburg, 1995; Randić, 1996). D'après Woolf et Salter (2000), la plasticité neuronale est le résultat d'une modification de l'expression génétique conduisant à l'hypersensibilité douloureuse. Ces modifications sont le résultat des changements de l'expression de gènes contrôlés par des facteurs de transcription activés par plusieurs cascades de transductions intracellulaires. Cette expression génétique serait une des composantes de la modulation de l'activité des circuits qui se manifeste après leur activation.

Du fait de ses propriétés, le facteur de transcription  $\Delta$ FosB pourrait jouer un rôle clé dans des phénomènes de plasticité neuronale observés dans le cadre de douleurs prolongées. Le facteur  $\Delta$ FosB fonctionnerait comme un interrupteur moléculaire intermédiaire dans certaines adaptations les plus persistantes dans le cerveau, en réponse aux stimulations chroniques (Kelz et Nestler, 2000; Nestler et coll., 2001; McClung et coll., 2004). Dans le système nerveux  $\Delta$ FosB a été principalement étudié dans le contexte de l'épilepsie (Hope et coll., 1994a; Chen et coll., 1997; Morris et coll., 2000), de la dépendance (Hope et coll., 1994b; Pich et coll., 1997; Keltz et coll., 1999; McClung et Nestler, 2003), des comportements convulsifs (Werme et coll., 2002), de la dyskinésie (Andersson et coll., 2003), ou du stress (Inoue et coll., 2004; Perrotti et coll., 2004). A notre connaissance l'expression de  $\Delta$ FosB n'a pas été étudiée jusqu'à présent dans le contexte de la douleur.

#### **4. OXYDE NITRIQUE, INFLAMMATION ET DOULEUR**

L'oxyde nitrique (NO) joue un rôle important dans les processus inflammatoires, à la fois sur le site d'inflammation et dans les circuits neuronaux, en particulier spinaux, impliqués dans la douleur. Le NO est une petite molécule très réactive qui a une grande importance comme régulateur biologique. Il a été évoqué depuis 200 ans mais son histoire moderne a commencé au début des années 1980 avec les travaux de Furchgott et Zawadzki (1980) montrant que l'effet vasodilatateur de l'acétylcholine sur des segments isolés d'aorte de lapin est dû à une ou plusieurs substances, alors inconnues, sécrétées par l'endothélium et appelées pour cette raison «Endothelium-Derived Relaxing Factor» ou EDRF (Dinh-Xuan, 1998). En 1987, Palmer et son équipe (Palmer et coll., 1987) ont identifié un des EDRF comme étant le NO. Dès lors, de nombreux travaux ont montré le rôle de cette molécule dans de nombreuses fonctions biologiques telles que les réactions immunitaires, la réponse inflammatoire (Sennequier and Vadon-Le Goff, 1998), le choc septique, la neuromodulation dans le système nerveux central et périphérique (Szabo, 1996) et la contraction des muscles lisses et squelettiques (Clanton, 1998).

Le NO n'est pas une molécule de signalisation spécifique des mammifères (Kelm, 1999; Esplugues, 2002). En effet, des expériences récentes montrent sa présence chez des invertébrés tels que les arthropodes et les mollusques (Stefano et Ottaviani, 2002). Il s'agit donc d'une molécule ubiquiste que l'on rencontre depuis les organismes les plus «simples» comme les bactéries (Kröncke et coll., 1997) jusqu'aux organismes «supérieurs» comme l'homme (Park et coll., 2000).

Le NO présente un électron libre qui lui confère une grande réactivité chimique. D'autre part, sa charge nulle le rend soluble dans les solvants apolaires, ce qui facilite sa diffusion à travers les membranes cellulaires. La chimie du NO est dominée par sa nature radicalaire. Il réagit rapidement avec l'ion superoxyde  $O_2^-$  pour former l'ion peroxytrite  $ONOO^-$  connu pour sa toxicité cellulaire. En condition aérobie, le NO est rapidement oxydé en nitrites ( $NO_2^-$ ) et nitrates ( $NO_3^-$ ). Le NO a la propriété de se complexer avec le Fe (II). Cette propriété explique que le NO se fixe à toutes les protéines renfermant un groupement hémique et en particulier la guanylate cyclase soluble qui est l'une des ses principales cibles physiologiques. La courte demi-vie du NO en milieu biologique, de l'ordre de quelques secondes, rend sa quantification souvent difficile. Une des méthodes utilisées est la Résonance Paramagnétique

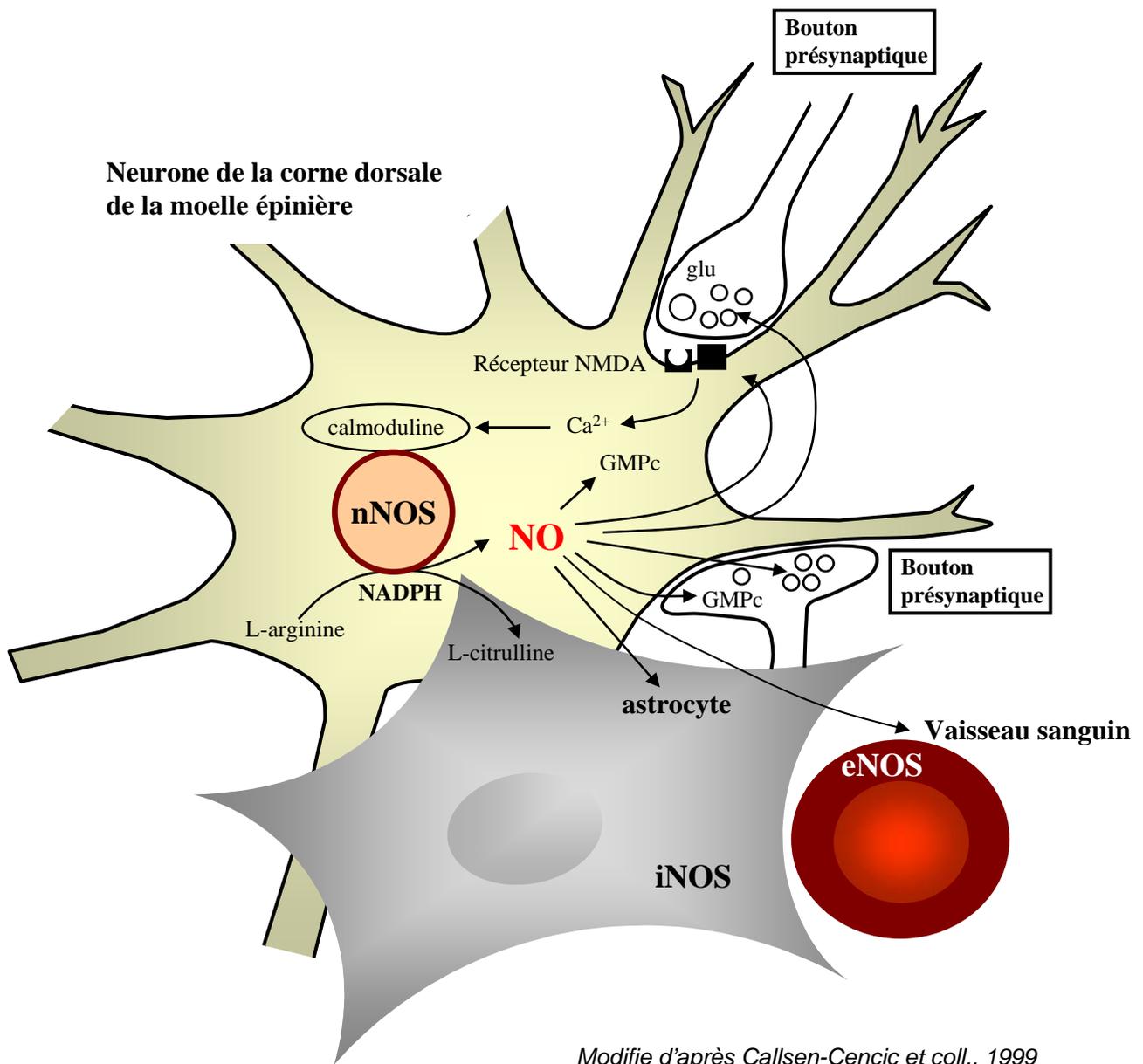
Electronique (RPE) fondée sur la formation de complexes ferriques (Nakagawa et coll., 2001; Kleschyov et coll., 2000).

#### **4.1 Les enzymes de synthèse du NO**

Le NO est synthétisé par des enzymes nommées en Anglais «Nitric Oxide Synthase» (NOS). A partir du  $\beta$ -nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADPH) et du dioxygène, l'enzyme oxyde la L-arginine en L-citrulline et NO (Figure 15).

Il existe trois isoformes de NOS purifiées et leurs ADNc ont été clonés chez l'homme. Les isoformes, codées par trois gènes différents sont localisées sur les chromosomes 7 (eNOS), 12 (nNOS) et 17 (iNOS) (Forstermann et coll., 1995 ; Chen et coll., 1998). La NOS dite neuronale (nNOS ou NOS I), prédomine dans les cellules nerveuses mais elle est aussi présente dans les cellules photoréceptrices et épithéliales. La NOS dite endothéliale (eNOS ou NOS III) prédomine dans les cellules endothéliales, y compris celles des vaisseaux cérébraux mais elle a aussi été identifiée dans des cellules nerveuses, les plaquettes sanguines et les myocytes. Ces isoformes sont constitutives tandis que la NOS inductible (iNOS ou NOS II) n'est exprimée qu'après induction par des facteurs tels que les cytokines provenant de macrophages, de lymphocytes ou de cellules macrogliales et microgliales. Dans le système nerveux, iNOS peut être exprimée de façon importante par les astrocytes. Elle peut également être exprimée spontanément par les cellules épithéliales du poumon et les plaquettes sanguines (Moncada et coll., 1991). Au cours des processus inflammatoires, la production de NO au site d'inflammation semble être principalement due à l'activité de la iNOS. Cette enzyme interviendrait dans l'effet protecteur du NO dans la prévention de l'apoptose et dans le processus de cicatrisation (Chen et coll., 1998).

Les différents types de NOS possèdent la même structure générale mais leur régulation présente des différences (Tableau 4). La nNOS et l'eNOS sont régulées par la concentration en ions calcium dont dépend le couplage de l'enzyme avec la calmoduline. En revanche, la iNOS est indépendante du calcium car cette isoforme est couplée en permanence à la calmoduline (Marletta, 1993). Les autres moyens de régulation de l'activité NOS pourraient être la dimérisation (Hellermann et Solomonson, 1997), la phosphorylation (Michel et Feron, 1997), la concentration en L-arginine (Chang et coll., 1998), le complexe cavéoline dans l'endothélium (Chen et coll., 1998) ou une régulation par le NO lui-même (Rengasamy et Johns, 1993; Groves et Wang, 2000). L'impact de la biosynthèse de NO dépend d'une part, de



*Modifié d'après Callsen-Cencic et coll., 1999*

**Figure 15.** Schéma indiquant la production de NO à partir de la nNOS présente Dans les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière et l'action de NO.

## Tableau 4. Nitrique Oxyde Synthétases

	Type	Localisation dans la cellule	Cofacteur Ca <sup>2+</sup> / Calmoduline	Cofacteurs FAD, FMN, NADPH, BH <sub>4</sub>	Effecteurs membranaires	Fonction de NO	Inhibiteurs	Maladies dans lesquelles NO est impliqué
<b>NOS neuronal</b> <b>NOS-1</b> <b>nNOS</b> (nNOS $\beta$ , nNOS $\gamma$ , nNOS $\mu$ , nNOS-2)	constitutive	Cytosol (neurone)	dépendante	dépendante	Acides aminés neuro-excitateurs	Neurotransmetteur	L-NAME 7-NI 7-NINA L-NMMA	+ Ischémie cérébrale - Impuissance sexuelle + Parkinson, Sclérose, Alzheimer
<b>NOS inducible</b> <b>NOS-2</b> <b>iNOS</b> (iNOS $\beta$ -s)	inductible	Cytosol (macrophage, astrocyte)	indépendante	dépendante	Lipopolysaccharides, Interféron, Interleukine 1 Cytokines	Bactéricide, Tumoricide	L-NAME Aminoguanidine 1400W	+ Maladies neurodégénératives, Choc septique, Arthrite, Diabète, Cancer
<b>NOS endothéliale</b> <b>NOS-3</b> <b>eNOS</b>	constitutive	Cytosol membranes, (cellule endothéliale)	dépendante	dépendante	Acétylcholine, Bradykinine Sérotonine - ATP	Endothelium derived relaxing factor	L-NAME L-NMMA TRIM	- Hypertension, Athérosclérose, Angine de poitrine + Migraines
<b>NOS mitochondrial</b> <b>mtNOS</b>	constitutive	Mitochondrie	dépendante	dépendante		Modulateur		Ischémie

la quantité produite et d'autre part, des cibles situées à proximité du lieu de synthèse. Par exemple, lorsque la cible est une enzyme, le NO peut provoquer selon le cas, soit une activation soit une inhibition. Ceci explique que le NO puisse jouer un rôle cytoprotecteur (Arnett et coll., 2002) ou un rôle cytotoxique (Kröncke et coll., 1997), comme le double visage du Dieu Janus.

#### **4.2 Action générale du NO dans le système nerveux**

Un des rôles les plus intéressants du NO provient de sa diffusion due à sa capacité à traverser les membranes. Cette propriété lui permettrait de synchroniser des processus biologiques appartenant à son volume de diffusion. Au sein du système nerveux central, le NO émis par certains éléments post-synaptiques à la suite de leur excitation diffuserait dans la fibre pré-synaptique où, en augmentant l'intensité des influx nerveux, il interviendrait dans les processus de potentialisation à long terme (Kendrick et coll., 1997). Le NO pourrait aussi être impliqué dans la neurogenèse, en participant au contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire de la zone sous-ventriculaire (Matarredona et coll., 2005). De plus, le NO influence l'expression génétique de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Hemish et coll., 2003). Les effets du NO dans le système nerveux ont été montrés par l'utilisation d'inhibiteurs comme L-NMMA (N<sub>G</sub>-mono methyl-L-arginine), L-NAME (N<sub>G</sub>-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride), L-NA (N<sub>G</sub>-nitro-L-arginine) ou 7-NI (7-nitroindazole), ce dernier étant relativement spécifique de la nNOS (Sakurada et coll., 2001; Tedesco et coll., 2002). Le NO a un rôle potentiel de transmetteur rétrograde mais il est possible qu'il agisse aussi sur le neurone qui le produit ou qu'il diffuse vers les neurones voisins ou les cellules gliales adjacentes, comme le ferait un neurotransmetteur classique (Moncada et coll., 1991). Cet effet volumique se manifeste également sur la circulation sanguine dans le cerveau. Celle-ci est sous la double influence de nNOS et eNOS (Cholet et coll., 1997).

Le NO joue un rôle important dans la pathologie du système nerveux central. Il est en effet possible que l'augmentation de l'activation du récepteur NMDA et l'augmentation de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire qui lui est associée permettent au NO d'intervenir dans la neurotoxicité du glutamate (Moncada et coll., 1991). D'autre part, une forte quantité de NO entraîne l'inhibition d'enzymes essentielles au fonctionnement cellulaire comme la ribonucléotide réductase et certaines enzymes du transport électronique mitochondrial (Stewart et coll., 2002). Les différentes formes peuvent également avoir des effets spécifiques. En effet, le NO

étant une substance agissant après diffusion, son action sur une cellule cible dépend de plusieurs sources variables selon les conditions physiologiques. Par exemple, au cours des phénomènes inflammatoires induits par les cytokines, le NO est plus particulièrement produit sous l'effet de la iNOS (Park et coll., 1994). Une augmentation de nNOS peut aggraver les conséquences d'une ischémie cérébrale et sa diminution provoquer l'impuissance sexuelle masculine. L'augmentation d'iNOS est liée au choc septique, au diabète et à certains cancers, tandis que la diminution d'eNOS est impliquée probablement dans l'hypertension et l'athérosclérose alors que son augmentation est associée à la migraine (Sennequier et Vadon-Le Goff, 1998).

#### **4.3. Les NOS dans la moelle épinière**

Il a été montré que la nNOS est présente dans la moelle épinière, essentiellement dans les neurones de la corne dorsale (Randich et coll., 1997; Goff et coll., 1998), dans les ganglions de la racine dorsale (Meller et Gebhart, 1993; Luo et Cizkova, 2000) et dans les motoneurones (Saito et coll., 1994). La localisation de nNOS dans la corne dorsale où projettent les fibres nerveuses impliquées dans la transmission de la nociception suggère que le NO intervient dans la transmission du message nociceptif (Maihöfner et coll., 2000a; Vetter et coll., 2001). Ces données morphologiques ont été confirmées par des études fonctionnelles montrant que les inhibiteurs de NOS augmentent le seuil de perception de la douleur (Aley et coll., 1998; Tedesco et coll., 2002).

Des études pharmacologiques ont montré que l'augmentation de débit sanguin de la moelle épinière lors d'une stimulation nociceptive dépend du NO d'origine neuronale. Des expériences immunohistologiques complémentaires ont montré une innervation des vaisseaux de la moelle épinière par des terminaisons nerveuses contenant la nNOS (Zochodne et coll., 2001). En revanche, la présence d'eNOS dans l'endothélium des vaisseaux sanguins de la moelle épinière n'a fait l'objet d'aucune étude. D'autre part, des études immunocytologiques montrent qu'une stimulation nociceptive produite par une inflammation sous-cutanée s'accompagne d'une augmentation de l'étendue du marquage immunologique de type nNOS (Maihöfner et coll., 2000b; Gao et Qiao, 1998; Keilhoff et coll., 2000; Levy et Zochodne, 1998). Ces résultats suggèrent qu'une libération accrue de NO d'origine neuronale peut participer à l'hyperalgésie produite par ce type de stimulation nociceptive. Des expériences récentes impliquent les cellules gliales de la moelle épinière dans l'expression et le maintien

de la douleur. Les astrocytes et la microglie sont activés en réponse à une vaste gamme de conditions incluant l'inflammation sous-cutanée qui peuvent produire une hyperalgésie (Murphy, 2000; Watkins et coll., 2001). L'activation des cellules gliales provoque l'expression d'iNOS mais le rôle spécifique de cette enzyme dans la transmission de la douleur est controversé.

#### **4.4 L'oxyde nitrique et la douleur**

Le NO semble jouer un double rôle dans la modulation de la douleur, à l'instar du double rôle que le NO montre dans la plupart des tissus. Le NO synthétisé par les enzymes constitutives est produit en petites quantités et pendant une courte durée tandis que le NO fabriqué par l'iNOS en réponse aux stimulations inflammatoires et infectieuses est produit en grande quantité et pour une durée plus longue (Berrazueta et coll., 1992). Des études suggèrent que le NO intervient dans l'analgésie périphérique et centrale. Elles montrent que l'acétylcholine, substance qui stimule la libération de NO constitutive, réduit l'hyperalgésie induite par la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), la carragénine et l'acide acétique (Duarte et coll., 1992; Ferreira et coll., 1992). Des études utilisant des donneurs exogènes de NO, tels que le nitroprussiate de sodium et la nitroglycérine, montrent que ces substances sont des antagonistes de l'hyperalgésie induite par la carragénine ou la PGE<sub>2</sub>. Les effets sont bloqués par le bleu de méthyle, inhibiteur de la guanylate cyclase, ce qui suggère que la stimulation de GMPc sert d'intermédiaire à l'effet anti-nociceptif de NO (Osborne et Coderre, 1999; Budzinski et coll., 2000; Dolan et coll., 2000). En revanche, d'autres études montrent des effets pro-nociceptifs du NO dans différents modèles de douleur induite par la carragénine, la capsaïcine, le glutamate, la formaline ou par des stimulations mécaniques (Haley et coll., 1992; Salvemini et coll., 1996; Callsen-Cencic et coll., 1999; Chen et Levine, 1999; Kawamata et Omote, 1999; Leong et coll., 2000). D'après Luo et Cizkova (2000), de telles différences (effets pro-nociceptifs vs effets anti-nociceptifs) sont peut-être dues au fait que l'expression de NOS dans les neurones de la moelle épinière est régulée de façon différentielle. Elle peut être régulée par l'activation de différentes fibres afférentes, par l'intensité et la durée du stimulus nociceptif, par l'environnement local du site de la lésion, par la sévérité et la durée de l'inflammation et par différentes cytokines qui peuvent activer les afférences primaires avec des intensités variables qui résultent, selon le cas, en une augmentation ou une diminution de l'expression. D'autre part, le NO peut être une molécule messagère de différents types de neurones, excitateurs (Bogdanov et Wurtman, 1997) et

inhibiteurs (Valtschanoff et coll., 1992b). L'activation de neurones excitateurs par le NO résulterait en une hyperalgésie, tandis que l'activation des interneurons inhibiteurs peut produire une hypoalgésie.

Le rôle de NO dans l'inflammation est incertain et complexe. Par exemple dans l'inflammation de la peau induite par des allergènes, le NO est pro-inflammatoire à basse concentration, en induisant une vasodilatation et le recrutement des neutrophiles, et anti-inflammatoire à haute concentration en inhibant l'expression des molécules d'adhésion et en induisant l'apoptose des cellules inflammatoires (Ross et Reske-Kunz, 2001).

Les propriétés cyto-protectrices du NO (Ignarro et coll., 1999), dérivées de sa capacité à augmenter le flux sanguin et à complexer les radicaux libres destructeurs, ont donné naissance à des molécules anti-inflammatoires appelées NO-AINS qui permettent d'éviter l'effet toxique sur le système gastro-intestinal de l'utilisation à long terme des médicaments AINS qui sont les plus utilisés dans le traitement de la douleur inflammatoire. Ces molécules sont synthétisées par estérification d'un donneur de NO avec un AINS conventionnel tel que l'aspirine (NO-aspirine), le naproxen (NO-naproxen) ou le diclofenac (nitrofenac). Elles semblent améliorer l'efficacité anti-inflammatoire et anti-nociceptive des AINS dans l'inflammation, les maladies neurodégénératives et le cancer, apparemment sans effet adverse (Burgaud et coll., 2002a,b; Keeble et Moore, 2002).

Récemment, d'autres donneurs de NO appelés «nitric oxide donating drugs» (NODD) et liés à des molécules chimiquement différentes des AINS ont été synthétisées. On peut citer en exemple, le nitroparacetamol (NO-paracetamol), le nitroprednisolone (NO-prednisolone) et le nitromesalamine (NO-mesalamine). Ce sont des molécules potentiellement utilisables dans le traitement de l'asthme, des maladies du foie et de l'impotence (Burgaud et coll., 2002a,b; Keeble et Moore, 2002).

## **5. OBJECTIFS DE LA THESE**

Nous avons choisi d'étudier la douleur inflammatoire chez le rat, non seulement pendant la phase précoce, mais aussi pendant la phase tardive. Nos objectifs sont les suivants:

### **Valider le test de nociception de la pince calibrée Bioseb**

Des études récentes (Yu et coll., 2002; Skyba et coll., 2005) ont utilisé des pinces de fabrication artisanale et équipées de capteurs de tension pour étudier le seuil de douleur à une stimulation mécanique. La société Bioseb a développé un modèle industriel que nous avons testé. Nous avons évalué la précision, la sensibilité et la fiabilité de ce dispositif commercialisé en utilisant un modèle de douleur inflammatoire induite par la carragénine (modèle carragénine). Cette pince a ensuite été utilisée pour une étude de l'analgésie et la tolérance à la morphine.

### **Etudier l'expression de FosB/ $\Delta$ FosB dans la moelle épinière du rat lors d'une douleur de type inflammatoire**

L'implication de  $\Delta$ FosB dans beaucoup de stimulations répétées ou soutenues suggère que ce facteur de transcription est impliqué dans la plasticité connexe à la douleur. Dans ce travail, nous avons étudié la possibilité de l'expression de  $\Delta$ FosB dans la moelle épinière de rat lors d'une douleur inflammatoire en utilisant deux anticorps qui identifient pour l'un FosB et  $\Delta$ FosB et pour l'autre, seulement FosB.

### **Etudier l'expression de nNOS dans la moelle épinière du rat lors d'une douleur de type inflammatoire**

Les données exposées dans les paragraphes précédents montrent que le NO joue un rôle important dans la nociception. De plus, une étude montre que le NO potentialise l'expression de c-Fos induite par la carragénine (Honoré et coll., 1995), suggérant par là que cette molécule a un effet sur l'expression des facteurs de transcription. Notre but est d'étudier le NO dans un modèle de douleur chronique de type inflammatoire induite par l'injection intraplantaire de carragénine ou de zymosan en centrant notre étude sur la nNOS. Dans ce contexte, après avoir caractérisé la répartition de nNOS dans la moelle épinière et son éventuelle modification au cours de l'inflammation, nous avons recherché la possible co-localisation de nNOS et c-Fos ou nNOS et  $\Delta$ FosB dans les neurones des cornes dorsales de la moelle épinière.

## **II. Matériel et Méthodes**

*Tout vouloir a pour principe, un besoin, un manque donc  
une douleur ; c'est par nature, nécessairement, qu'ils  
(l'homme et la bête) doivent devenir la proie de la douleur*

*Shopenhauer*

*Le monde comme volonté et comme représentation*

*tI, p323-325*

## **II. MATERIEL ET METHODES**

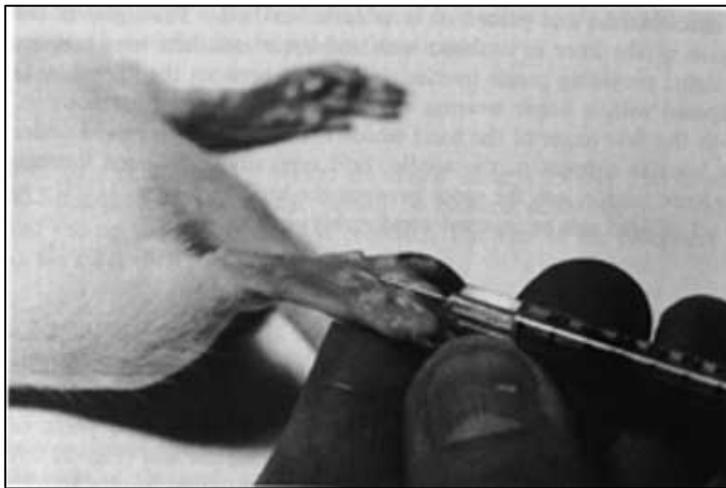
### **1. ANIMAUX**

Les études sont menées sur des rats Sprague-Dawley mâles (180-220 g ; élevage Janvier, Le Genest St Isle, France) placés dans des cages individuelles ou à raison de 3-4 rats par cage pour les tests de comportement dans un environnement standard (24°C, cycles jour/nuit 12:12 h, phase lumineuse 7 h-19 h). Les rats ont libre accès à l'eau et à la nourriture. La répartition des animaux entre les groupes expérimentaux (naïf, contrôle, traité) est effectuée de manière aléatoire ainsi que la position des cages sur les chariots dans l'animalerie. Au moins une semaine d'habituation est appliquée aux animaux avant le début des expériences. Les animaux sont manipulés et pesés tout les jours afin de les familiariser avec les expérimentateurs. Lors des tests de comportement effectués pendant la phase lumineuse, les animaux sont placés dans la pièce d'expérimentation 2 h avant le début des expériences. L'expérimentation animale est pratiquée dans le respect de la législation européenne (directive du Conseil de l'Europe 86/669/EEC du 24 novembre 1986), les recommandations éthiques pour l'expérimentation animale de l'IASP (Zimmermann, 1983), avec l'autorisation du Ministère de l'Agriculture et du Ministère de la Recherche et avec l'avis du Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg (CREMEAS) registre AL/O1/02/06/04.

### **2. TRAITEMENTS**

#### **2.1 Injection intraplantaire de zymosan**

Le traitement est réalisé par une injection sous cutanée, intraplantaire de 100  $\mu$ L de Zymosan A (polysaccharide produit par la paroi cellulaire du *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) 5 % dilué dans du tampon phosphate 0,1 M, NaCl 0,9 %, pH = 7,4 (PBS) à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille de 26 gauges (0,45 x 12 mm) dans la région plantaire de la patte postérieure droite des rats (Figure 16). Les



**Figure 16. Injection sous cutanée intraplantaire**

animaux du groupe contrôle reçoivent 100  $\mu$ L de PBS en appliquant le même protocole d'injection.

## **2.2 Injection intraplantaire de carragénine**

Selon le cas, une injection unilatérale intraplantaire de 200  $\mu$ L de  $\lambda$ -carragénine 2 % ou 150  $\mu$ L de  $\lambda$ -carragénine 3 % (lot 80K1334, Sigma-Aldrich) diluée dans du NaCl 0,9 % (solution saline), est réalisée à l'aide d'une aiguille de 26 gauges, par voie sous cutanée dans les coussinets de la patte postérieure droite du rat (Figure 16).

Les animaux du groupe contrôle reçoivent 200  $\mu$ L ou 150  $\mu$ L de solution saline par voie intraplantaire.

## **2.3 Injection sous-cutanée de morphine**

L'injection sous-cutanée (sc) de 2,5 ou 10 mg/kg de morphine sulfatée (Francopia, Aramon, France, diluée dans du NaCl 0.9 %) est réalisée à l'aide d'une aiguille de 27 gauges (0,4 x 20 mm), par voie sous cutanée dans la région dorsale du rat à l'insertion du cou, 30 min avant de mesurer l'analgésie. Les animaux du groupe contrôle reçoivent une injection du même volume de solution saline.

Lors des expériences de tolérance à la morphine, les animaux reçoivent une injection sous cutanée de morphine (10 mg/kg) tous les jours pendant 5 jours. Le seuil de tolérance à la pression mécanique est mesuré avant l'injection de morphine (pré-injection) et 30 min après traitement (post-injection). La valeur de pression maximale appliquée sur la patte du rat est fixée à 2000 g afin d'éviter d'endommager le tissu. Cette valeur correspond à 2 fois la force maximale supportée par le rat dans des conditions contrôle.

## **3. MESURE DU VOLUME DE L'OEDEME**

Le volume de la patte est mesuré pour déterminer le volume de l'œdème induit par le traitement. La méthode utilisée, basée sur le principe d'Archimède, utilise une balance (Sartorius-Werke type 2204, précision = 0,1 g. Göttingen Allemagne), sur laquelle est posé un récipient cylindrique rempli d'eau. L'augmentation de poids indiquée par la balance est enregistrée lorsque la patte du rat est trempée dans l'eau jusqu'à l'articulation de la cheville.

Le volume d'eau déplacée par la patte correspond à un accroissement de la force appliquée sur le plateau de la balance tel que 1 g correspond à 1 ml.

## 4. TESTS COMPORTEMENTAUX

### 4.1 Test de Randall et Selitto

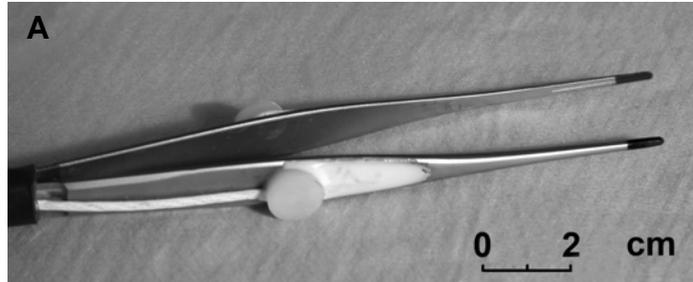
Le test de Randall et Selitto (1957) mesure le seuil de nociception à l'aide d'un algésimètre (Ugo Basile – Italie; **Figure 17A**). Cet appareil exerce une force qui s'accroît à une vitesse constante indiquée par la position d'un curseur le long d'une échelle graduée. La force est appliquée par un cône en plexiglas sur la face dorsale de la patte postérieure (**Figure 17B**). L'opérateur appuie sur une pédale pour déclencher le mécanisme. Lorsque le rat retire la patte, l'opérateur libère la pédale et lit sur l'échelle la force maximale appliquée sur la patte. Avant chaque test, le dispositif est replacé à la force la plus faible.

### 4.2 Test de la Pince calibrée

L'appareil développé par Bioseb (Chaville, France) est constitué d'une pince brucelle (longueur =15 cm; aire de contact: 7 mm x 1,5 mm; **Figure 18A**) sur laquelle sont fixés des capteurs de pression reliés à un dynamomètre électronique indiquant la force exercée (**Figure 18B**). Les capteurs de pression sont disposés sur les branches selon un positionnement qui assure une bonne sensibilité de l'ensemble (bonne réponse même sous de faibles charges) et une linéarité satisfaisante sur toute la plage de mesure (linéarité meilleure que 0,5 %). Le dispositif est également complété par un système de touches collées sur les branches afin que les différents expérimentateurs exercent tous leur action au même endroit et obtiennent ainsi une bonne répétabilité. La calibration de la pince est réalisée grâce à un jeu de masses étalons. La méthode de calibration mise au point par Bioseb (Andilog Technologies) en accord avec les standards européens NF EN 10002-2 de Décembre 1991, permet de tenir compte des efforts répartis sur les deux branches et de l'effet ressort de la pince. Les paramètres de calibration sont mis en mémoire dans l'interface électronique et la force peut être exprimée en diverses unités (g, kg, N, mN, oz, lb). Nous avons utilisé comme unité le gramme (g). Le dispositif affiche sur l'écran les valeurs en temps réel et indique la valeur maximale de la



**Figure 17. Test de Randall et Selitto. A) Algésimètre**  
**B) Utilisation de l'algésimètre.**



**Figure 18. A) Pince calibrée. B) Dynamomètre.**

pression exercée au cours de l'essai. Cet affichage permet à l'expérimentateur de s'exercer à l'utilisation de l'appareil et de contrôler la force mécanique appliquée durant le test. Après un essai, l'appareil peut être remis à zéro manuellement ou à l'aide d'une pédale.

Le seuil de pression mécanique est mesuré à l'aide de la pince calibrée (Luis-Delgado et coll., 2006) en plaçant les animaux sur une table et en les maintenant avec douceur à l'aide d'un chiffon masquant les yeux pour limiter les influences de l'environnement. Les pointes de la pince sont placées entre les deux faces de la patte postérieure en faisant attention à ce que la surface en contact avec la patte soit la même à chaque mesure. La force appliquée est augmentée manuellement à une vitesse régulière, approximative de 200g toutes les 3 secondes jusqu'au retrait de la patte (Figure 19). La mesure est répétée 3 fois pour chaque patte pendant chaque test et la moyenne de la force exercée sur chaque patte est déterminée.

#### **4.3 Filaments de Von Frey**

Les filaments de Von Frey (Touch Test<sup>®</sup>Bioseb, Chaville, France) sont des filaments en nylon de différentes tailles et diamètres (variations sur une échelle logarithmique) permettant d'exercer une pression calibrée à la surface de la peau. Les filaments utilisés permettent d'appliquer des pressions variant de 1 à 180 g (1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 26, 60, 100 et 180 g). Les rats sont placés sur une grille (maillage carré de 0,5 x 0,5 cm) dans des cages en plexiglas sans fond (dimension L x l x h = 24 x 14 x 33 cm) 10 min avant le début du test (Figure 20A). Le test est réalisé en appliquant 5 fois le même filament sur la voûte plantaire de la patte postérieure et en comptant le nombre de retraits en commençant par le filament le plus faible. Le seuil de pression appliquée sur la patte est défini comme la force minimale qui produit au moins 4 réponses de retrait de la patte sur les 5 stimulations.

#### **4.4 Plantar Test**

Nous avons utilisé le Plantar test (Ugo-Basile, Italie) pour évaluer la sensibilité nociceptive thermique chaude (Hargreaves et coll., 1988). L'équipement consiste en un émetteur mobile de rayon infrarouge (Halogène «Bellaphot», modèle 64607 OSRAM, 8V-50W), placé sous un panneau translucide sur lequel est posée une cage en Perspex<sup>®</sup> (polyméthylmethacrylate) de très bonne transparence optique, contenant 3 compartiments



**Figure 19. Test de la pince calibrée**



**Figure 20. A) Test de von Frey.  
B) « Plantar Test »**

séparés par des cloisons opaques (dimensions: L x l x h = 17 x 23 x 14 cm). L'intensité utilisée est de 70 sur une échelle comprise entre 0 et 99. Ce dispositif permet de tester 3 animaux simultanément (Figure 20B).

Les animaux sont installés dans les cages 10 min avant le début du test qui consiste à stimuler la voûte plantaire de la patte postérieure du rat à l'aide du faisceau infrarouge et à déterminer le temps de latence (en secondes) jusqu'au retrait de la patte. Le test est effectué 3 fois sur chaque patte et la latence moyenne de retrait pour chaque patte est calculée.

## 5. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

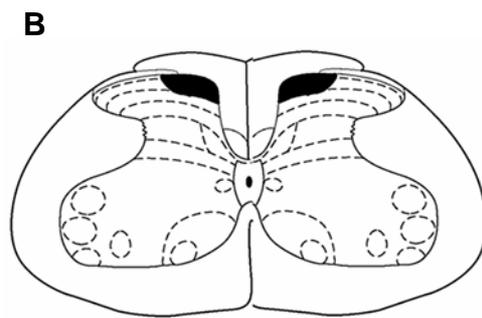
### 5.1 Perfusion des animaux et réalisation des coupes histologiques

Les animaux sont anesthésiés par une injection intra péritonéale d'uréthane 25 % à raison de 1,25 g/Kg ou d'une surdose d'hydrate de chloral (Sigma; 400 mg/mL, 3 mL/rat). Après ouverture de la cage thoracique, une canule reliée à une pompe péristaltique est introduite dans l'apex du cœur en activité pour être remontée jusqu'à l'embouchure de l'aorte. L'oreillette droite est immédiatement incisée pour assurer l'évacuation de l'excès de volume sanguin. Les rats sont ensuite successivement perfusés à un débit de 20 mL/min avec les solutions suivantes maintenues dans de la glace :

- Pour les coupes au cryostat : 100mL de PBS pour laver la circulation sanguine puis 300mL de mélange paraformaldéhyde (PAF) 4 % - glutaraldéhyde 0,2 % dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4, pour fixer le tissu et enfin, 100mL de la même solution additionnée de sucrose 10 %.
- Pour les coupes au vibratome : 100 mL de PBS 0,1 M, pH = 7,4, puis 200 mL de PAF 4 % dans du tampon phosphate 0,1M maintenu dans la glace ou de PAF 4%- acide picrique 0,6 %, dans du PBS.

Après perfusion, la moelle épinière est prélevée (Figure 21A) et post-fixée avec du PAF 4 % dans du tampon phosphate 0,1M pH 7,4 pendant 2 h à température ambiante.

- Pour les coupes au cryostat, la moelle épinière est ensuite déposée dans du sucrose 30 % pendant une nuit à 4°C en vue d'obtenir une cryoprotection. Après ce traitement, les échantillons sont congelés pendant 1 min environ dans de l'isopentane (Labosi) à -40°C puis conservés à -80°C. Des coupes transversales de la



**Figure 21. A)** Moelle épinière du rat montrant les niveaux lombaires.  
**B)** Moelle épinière, segment L4 montrant en noir les aires du comptage pour FosB-LI.

région lombaire de moelle épinière de 20  $\mu$ m d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un cryostat (2800 Frigocut, Reichert Jung) à -20°C, déposées sur des lames gélatinées et conservées à -20°C jusqu'au jour du marquage immunocytochimique.

- Pour les coupes au vibratome, la moelle épinière est conservée dans du PBS après post-fixation pendant 2 h à 4°C. Une encoche est pratiquée sur le côté controlatéral à la patte injectée sur la face ventrale de la région lombaire de la moelle épinière. Celle-ci est ensuite incluse dans de l'agar 2 % et coupée au vibratome (VT 1000S, Leica) en coupes transversales de 25  $\mu$ m d'épaisseur. Les coupes sont recueillies dans du PBS et stockées à 4°C jusqu'au jour de l'étude immunocytochimique.

## **5.2 Histologie: coloration au violet de crésyl**

Les contrôles histologiques sont réalisés à partir de coupes transversales de 25  $\mu$ m d'épaisseur de la région lombaire de la moelle épinière, coupées au vibratome. Après éclaircissement (2 x 5 min dans le xylène), les coupes sont réhydratées (passages successifs, de 5 min chacun dans des bains d'alcool à 100 % (deux fois), 95 %, 70 % et dans l'eau distillée) puis immergées pendant 30 min dans une solution de crésyl violet 0,5 % (Chroma Gesellschaft). Elles sont ensuite rincées dans l'eau distillée, déshydratées (1 min dans chaque bain d'alcool de 70 % à 100 % puis 2 x 5 min dans le xylène) avant d'être montées entre lame et lamelle dans de l'Eukitt.

## **5.3 Immunohistologie**

### **5.3.1 Immunoperoxydase**

Nous avons révélé les marquages de FosB et de FosB/ $\Delta$ FosB (FosB-LI) par la technique d'immunoperoxydase indirecte utilisant le complexe Avidine-Biotine (ABC) comme système d'amplification. Les coupes réalisées au vibratome sont d'abord lavées 3 fois dans du PBS (3 x 10 min), puis, après incubation dans du sérum d'âne 5 % dans du PBST (PBS supplémenté en Triton X-100 0,5 %; TX-100 Sigma-Aldrich; dans PBS) pendant 1 h, l'immunoréaction de FosB ou  $\Delta$ FosB est révélée en utilisant deux anticorps polyclonaux primaires produits chez le lapin et dirigés contre deux régions différentes de la protéine FosB. Un anticorps, "pan-

FosB", dilué à 1/5000, est dirigé contre la région interne de FosB (SC-48, Santa Cruz Biotechnology) et reconnaît FosB et  $\Delta$ FosB. L'autre anticorps, dilué à 1/2000, est dirigé contre la région C-terminale de FosB qui est absente dans  $\Delta$ FosB (acides aminés 317-334). Ce dernier anticorps reconnaît FosB mais ne reconnaît pas  $\Delta$ FosB (Perrotti et coll., 2004, 2005). Les coupes sont incubées toute la nuit à température ambiante avec l'anticorps primaire dilué dans du sérum d'âne 1 % dans PBST, puis les coupes sont incubées avec un anticorps secondaire biotinylé (antisérum d'âne anti IgG de lapin; Amersham Biosciences, 1/200) dilué dans du sérum d'âne 1% dans PBST pendant 90 min à température ambiante. Par la suite les coupes sont lavées 3 fois dans le PBS (3 x 10 min) et mises en présence du complexe ABC (Vectastain ABC kit, Vector Laboratoire, USA) pendant 1 h. Le complexe ABC est un système d'amplification de signal « Avidine-Biotine-Peroxydase » couplant, via l'avidine, plusieurs molécules de peroxydase biotinylée sur chaque anticorps secondaire biotinylé. Les coupes sont lavées 1 fois pendant 10 min dans le PBS et 2 fois 10 min dans le Tris (0,05 M, pH = 7,6) afin d'éliminer les traces de sels et de phosphate qui pourraient inhiber l'activité de la peroxydase ou entraîner la précipitation du nickel intervenant dans la réaction enzymatique. La révélation de la peroxydase est réalisée par un mélange : Tris 0,05 M ; nickel ammonium sulfate 5 mg/mL; diaminobenzidine 250 mg/mL; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,025 %. La peroxydase catalyse le transfert de 2 électrons de la diaminobenzidine sur l'eau oxygénée, en donnant 2 molécules d'eau et une molécule de diphénoquinone diamine insoluble et de couleur brune. Enfin, les coupes sont lavées 1 fois dans du Tris (1 x 10 min) et 2 fois dans du PBS (2 x 10 min). Elles sont finalement montées sur lames gélatinées, déshydratées dans des bains d'alcool de concentrations croissantes et de xylène (eau, alcool 70°, 90°, 100° 2 fois, xylène 2 fois) et mises sous lamelles avec de l'Eukitt. Des contrôles sont effectués en omettant les anticorps primaires.

### **5.3.2 Immunofluorescence**

Nous avons révélé le marquage de nNOS, par la technique d'immunofluorescence.

Les coupes sur lames de la région lombaire de la moelle épinière faites au cryostat sont pré-incubées dans le mélange de rinçage A suivant: sérum d'âne 5 % / sérum albumine bovine 1 % (BSA, Sigma-Aldrich) / Triton X-100 0,2 % dans du PBS, pendant 2 h en chambre humide à température ambiante afin de diminuer l'intensité des marquages non spécifiques. L'anticorps primaire monoclonal de souris anti-nNOS (Sigma-Aldrich) dilué au 1/200 dans le mélange A est appliqué après 3 rinçages successifs de 5 min dans du PBS et incubé 1 nuit à 4°C en chambre humide. Après trois rinçages dans le PBS, les coupes sont incubées avec

l'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à FITC (Sigma-Aldrich) dilué au 1/200 avec le mélange A pendant 2 h à température ambiante et à l'obscurité. Après trois rinçages par le PBS, les coupes sont montées sous lamelle avec du Vectashield (Vector Laboratories), milieu de montage utilisé pour éviter la perte de fluorescence ou «bleaching». Des contrôles sont effectués en omettant les anticorps primaires. Les coupes ainsi préparées sont prêtes à l'observation en microscopie à fluorescence.

Les doubles marquages de nNOS avec respectivement, c-Fos, Glut1 et FosB/ $\Delta$ FosB réalisés sur des coupes flottantes, sont révélés par la technique d'immunofluorescence selon le protocole suivant:

Les coupes sont lavées dans du PBS (3 x 10 min) et incubées dans un mélange de BSA 3 % / TX-100 0,1 % dans PBS pendant 1 h pour bloquer le marquage non spécifique. Elles sont ensuite incubées dans un des couples d'anticorps primaires suivants toute la nuit à 4°C:

- Anticorps monoclonal de souris anti-nNOS dilué au 1/200 plus anticorps polyclonal de lapin anti-c-Fos (4: sc-52, Santa Cruz Biotechnology) dilué au 1/4000.
- Anticorps monoclonal de souris anti-nNOS dilué au 1/200 plus anticorps polyclonal de lapin anti-Glut-1 (anticorps dirigé contre le transporteur de glucose Glut-1, Chemicon International) dilué au 1/500.
- Anticorps monoclonal de souris anti-nNOS dilué au 1/200 plus anticorps polyclonal de lapin anti-FosB/ $\Delta$ FosB (102: sc-48, Santa Cruz Biotechnology) dilué au 1/400.

Toutes les coupes sont diluées et rincées dans le mélange BSA 3 % / TX-100 0,1 % dans le PBS. Après 3 rinçages (3 x 10 min), les coupes sont incubées en présence des anticorps secondaires.

- anti-nNOS est révélé avec un anticorps anti-IgG de souris produit chez l'âne couplé à FITC, dilué au 1/200.
- anti-Glut-1, anti-c-Fos et anti-FosB sont révélés avec un anticorps anti-IgG de lapin couplé à Cy3, dilué au 1/500 produit chez l'âne.

Les anticorps produits chez l'âne sont dilués avec le mélange BSA 3 % / TX-100 0,1 % dans PBS et les coupes sont incubées pendant 2 h à température ambiante et à l'obscurité. Après trois rinçages avec PBS, les coupes sont montées sous lamelles avec du Vectashield. Des contrôles sont effectués en omettant les anticorps primaires. Les coupes ainsi préparées sont prêtes à l'observation en microscopie à fluorescence.

#### **5.4 Quantification de cellules immunopositives à FosB et à $\Delta$ FosB**

Les images numériques des coupes de la région lombaire (L1-L5) de la moelle épinière (Figure 21A) sont acquises à l'aide d'un objectif 10x monté sur un microscope à Leica LEITZ DMRD. Nous avons utilisé les planches de Molander et Grant (1995) pour identifier les différents segments de la région lombaire. Le nombre de noyaux des cellules immunomarquées est compté dans la région des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière (laminae I et II: Figure 21B) correspondant à la région de projection des neurones somato-sensoriels de la surface plantaire du rat (Grant, 1995) ainsi que dans les couches profondes (III-V). Le nombre de cellules positives est compté bilatéralement à l'aide du logiciel d'analyses d'images, ImageJ (1.32v, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). Lorsqu'il est possible d'obtenir plus de 3 coupes pour le même segment spinal, la valeur moyenne est prise en compte comme une seule observation.

#### **6. MESURE DE L'ACTIVITE DE LA MYELOPEROXIDASE**

Nous avons mesuré l'activité de la myéloperoxydase (MPO) comme témoin de l'inflammation. Cette activité permet de quantifier la séquestration de neutrophiles dans la patte du rat faisant suite à l'injection de carragénine. Nous avons utilisé la méthode décrite par Bhatia et coll., 2005. Les animaux sont guillotisés et les deux pattes postérieures sont prélevées dans la carboglace et conservées à -80°C. Le jour du dosage, les pattes sont décongelées et homogénéisées dans 1 mL de tampon phosphate 20 mM pH = 7,4 puis centrifugées à 10.000 x g pendant 10 min à 4°C. Le sédiment résultant est suspendu dans du tampon phosphate 50 mM pH = 6,0 additionné de bromure de hexadecyltriméthylammonium (HTAB, Sigma-Aldrich) 0,5 % (v/v). La suspension est soumise à 4 cycles de congélations et décongelations, soniquée (40 sec), puis centrifugée à 10.000 x g, pendant 5 min à 4°C et le surnageant est utilisé pour le dosage de MPO. Le milieu réactionnel est constitué d'un mélange du surnageant (50  $\mu$ L), de tétraméthylbenzidine (1,6 mM. Sigma-Aldrich), de PBS (80 mM, pH 5,4), et d'eau oxygénée ( $H_2O_2$ , 0,3 mM. Sigma-Aldrich). Le volume final d'incubation est de 100  $\mu$ L. La réaction est réalisée à 37°C pendant 110 sec et stoppée par l'addition de 50  $\mu$ L de  $H_2SO_4$ , 0,18 M. L'activité de la MPO est évaluée par la mesure de la densité optique (DO) à 450 nm et ramenée à la concentration d'ADN évaluée par la mesure de

la densité optique de 10  $\mu$ L de surnageant à 260 nm. Les résultats sont exprimés par le rapport entre les deux DOs.

## **7. ANALYSE STATISTIQUE**

L'analyse statistique est réalisée à l'aide du logiciel Statistica 5.1 (Statsoft, Tulsa, OK, USA), en utilisant une analyse de variance multifactorielle (ANOVA). Le traitement (injection de milieu salin, carragénine ou morphine) intervient comme un facteur intergroupe tandis que le côté mesuré (ipsi- ou controlatéral) intervient comme un facteur intra-sujet. Le temps de mesure (1-7 h et 24 h pour l'étude de la phase aiguë et 1, 3, 7, 14 ou 28 jours pour l'étude de la phase chronique) intervient comme un facteur intra-sujet (mesures répétées dans le temps sur le même animal) dans les expériences de comportement et comme un facteur intergroupe dans la quantification de FosB-LI. Il est également tenu compte des interactions entre facteurs. Lorsque le test d'ANOVA est positif, les comparaisons multiples entre points individuels, sont réalisées avec le Test de Tukey. Le niveau de significativité est fixé à  $p \leq 0,05$ . Symboles utilisés: \* si  $p < 0,05$ , \*\* si  $p < 0,01$ , \*\*\* si  $p < 0,001$ . Les données sont présentées sous la forme d'une moyenne  $\pm$  erreur type (S.E.M).

L'étude immunocytoologique de FosB-LI est réalisée à partir de 5 rats naïfs, 30 rats témoins ayant reçu une injection de solution saline et de 33 rats ayant reçu de la carragénine. Une analyse complète du nombre de cellules marquées à tous les niveaux de coupes n'a été obtenue que sur 14 rats. En conséquence dans les études statistiques qui prennent en compte le niveau de coupes, chaque valeur est considérée de manière indépendante (facteur intra sujet). En revanche pour un niveau de coupe donné la valeur obtenue pour chaque rat intervient de manière indépendante.

## **8. PROTOCOLES EXPERIMENTAUX**

### **8.1 Caractérisation et validation de la pince Bioseb**

Une première série d'expériences a permis de caractériser la pince en appliquant le test à des animaux naïfs 1 fois par jour tous les jours pendant 9 jours ou pendant 2 h toutes les 30 min, matin et après midi.

La pince a ensuite été validée par deux séries d'expériences réalisées sur des rats naïfs.

1 Nous avons demandé à 2 expérimentateurs d'appliquer le test aux mêmes animaux 1 fois par jour tous les jours pendant 4 jours de façon alternée. L'un des expérimentateurs était un manipulateur entraîné à l'utilisation de la pince tandis que l'autre ne l'avait jamais utilisée.

2 Nous avons appliqué le test à un modèle expérimental consistant à évaluer l'analgésie et la tolérance produites par une injection de morphine 10 mg/kg par jour pendant 5 jours.

### **8.2 Etude du modèle carragénine**

La stimulation douloureuse est obtenue par injection intraplantaire de 150µL de carragénine 3%, dans la patte postérieure du rat. Les rats contrôles reçoivent le même volume de solution saline.

#### **8.2.1 Caractérisation de l'inflammation**

Les volumes de la patte injectée et de la patte controlatérale sont mesurés avant injection et 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 24 h et 3, 7, 14 et 28 jours après traitement par la carragénine.

Le dosage de la MPO est réalisé dans les deux pattes postérieures des rats naïfs et des rats injectés avec la carragénine ou contrôles, 6 h, 1, 3 et 7 jours après traitement.

### **8.2.2 Tests de seuil de sensibilité**

Nous avons utilisé deux tests pour mesurer le seuil de sensibilité mécanique, les filaments de Von Frey et la pince calibrée Bioseb. Pour mesurer le seuil de sensibilité thermique à la chaleur, nous avons utilisée le test Plantar.

- Les filaments de Von Frey sont appliqués 1 fois par jour avant injection et 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 24 h puis 3, 7, 14 jours après injection de carragénine ou de solution saline.
- La pince calibrée Bioseb est appliquée 1 fois par jour avant injection et 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 24 h puis 3, 7, 14 et 28 jours après injection de carragénine ou de solution saline.
- Le test Plantar est appliqué 1 fois par jour avant injection et 1, 3, 7, 14 et 28 jours après injection de carragénine ou de solution saline.

### **8.2.3 Facteurs de transcription**

Tous les marquages de FosB spécifique et FosB-LI sont réalisés sur des coupes vibratome transversales de la région lombaire (L1-L5) de la moelle épinière de rat en appliquant la technique d'immunoperoxydase.

Le marquage de FosB spécifique est réalisé 8 h puis 1, 3, 7, 14 et 28 jours après injection de carragénine. Le marquage de FosB-LI est effectué sur des rats naïfs et des rats ayant reçu une injection de solution saline ou de carragénine 1, 3, 7, 14 et 28 jours après le traitement.

## **8.3 Immunohistologie de nNOS et douleur inflammatoire**

### **8.3.1 Répartition de nNOS dans la moelle épinière chez les rats naïfs**

L'étude d'immunofluorescence de la répartition de nNOS dans la région lombaire (L1-L5) de la moelle épinière est faite sur des coupes transversales faites au cryostat chez des rats naïfs.

### **8.3.2 Répartition de nNOs dans le modèle inflammatoire**

#### *8.3.2.1 Modèle zymosan*

Une injection intraplantaire de 100µL de zymosan 5 %, est pratiquée dans la patte postérieure du rat. Les rats contrôles reçoivent le même volume de PBS.

Le zymosan n'a été utilisé que dans cette série expérimentale. Un contrôle de son effet sur la nociception a été effectué en utilisant le test de Randall-Selitto. Ce test est effectué sur les 2 pattes postérieures de tous les rats, trois fois par jour pendant 10 jours avant les traitements puis trois fois par jour pendant 5 jours après les traitements.

L'étude en immunofluorescence du nNOS est réalisée sur des coupes cryostat de la région lombaire (L1-L5), 4, 6, 24, 48, 72 et 168 h après injection de zymosan ou de PBS.

#### *8.3.2.2 Modèle carragénine*

- L'étude en immunofluorescence de nNOS après injection intraplantaire de carragénine ou de la solution saline est effectuée sur des coupes au vibratome de la région lombaire de la moelle épinière de rat, 4, 6, 24, 48, 72 et 168 h après le traitement.
- Le marquage de c-Fos et le double marquage nNOS/c-Fos sont pratiqués sur des coupes au vibratome de la région lombaire de la moelle épinière de rats 3 h après l'injection intraplantaire de carragénine. Le double marquage nNOS/Glut-1 est réalisé 24 h après traitement et le double marquage nNOS/ FosB-LI, 3 jours après traitement.

### **III. Résultats**

*La force qui fait le plus de fois le tour de la terre*

*En un seconde, ce n'est pas l'électricité,*

*C'est la douleur*

*Marcel Proust*

*Extrait d'Albertine disparue*

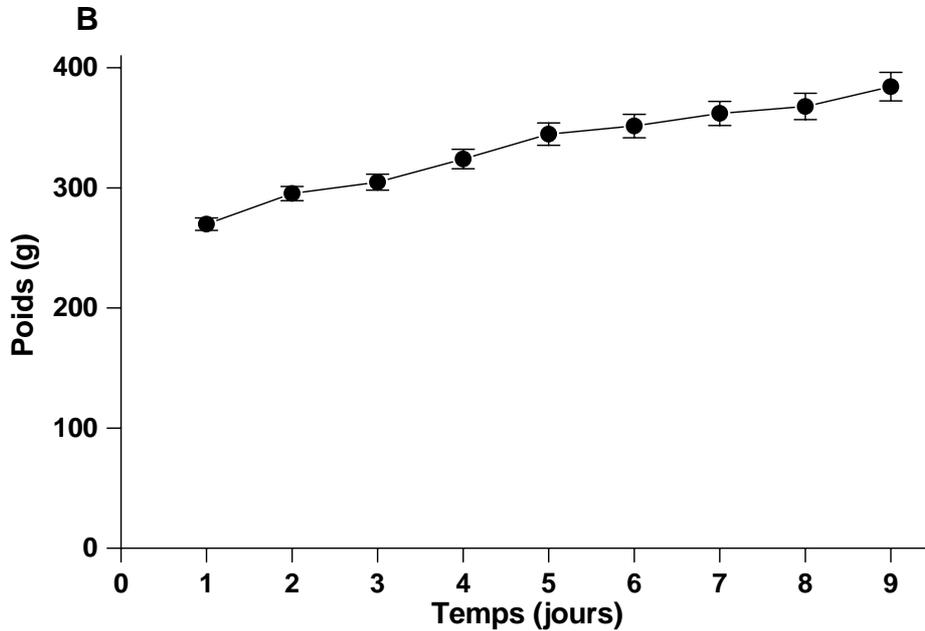
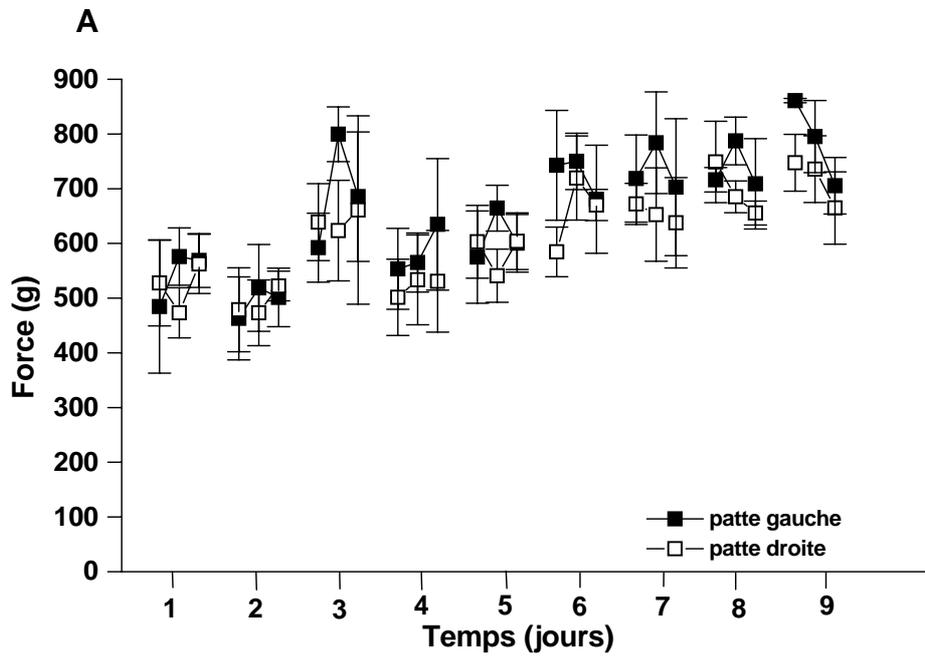
### III. RESULTATS

#### 1. Caractérisation et validation de la pince Bioseb chez les animaux naïfs

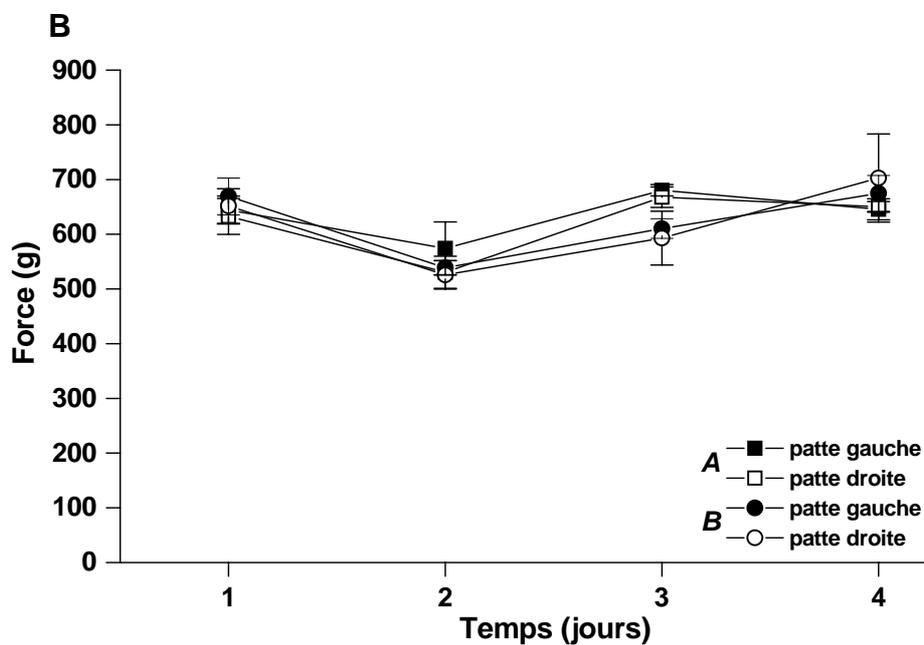
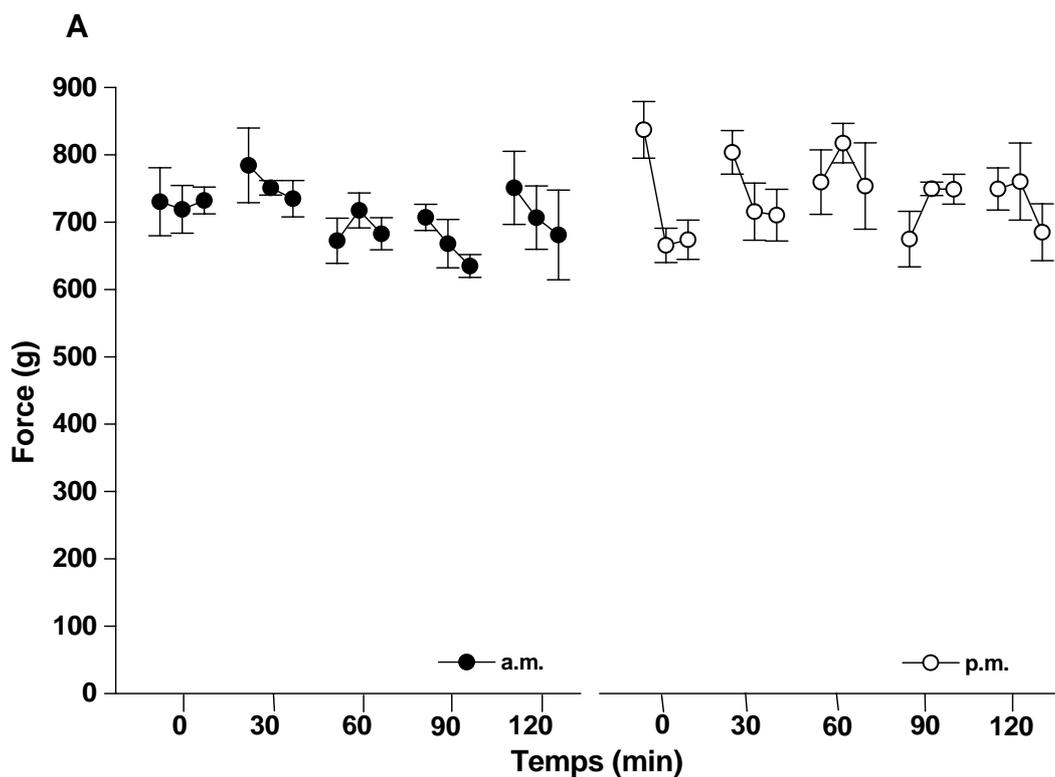
##### 1.1 Caractérisation

Les animaux naïfs sont examinés pendant 9 jours consécutifs pour évaluer l'effet des mesures sur le seuil de sensibilité douloureuse. Avant la session de tests, les animaux sont manipulés quotidiennement pendant une semaine afin de diminuer le stress dû à la manipulation. Chaque jour de test, le seuil nociceptif basal de 3 essais consécutifs sur les deux pattes postérieures du rat est évalué. L'étude statistique ne montre aucune différence significative du seuil de pression entre les 3 mesures faites ou entre les deux pattes (Figure 22A). Le seul effet significatif est celui du facteur *temps* ( $F_{8, 24} = 94$ ,  $p < 0,001$ ). En effet le seuil de sensibilité augmente progressivement entre le jour 1 et le jour 9. Une analyse de régression ( $R = 0,87$ ,  $p = 0,003$ ) confirme une augmentation linéaire significative des valeurs moyennes du seuil de sensibilité au cours des 9 jours (pente =  $29,1 \pm 6,2$  g/j). Pendant la même période la masse corporelle des rats augmente également (Figure 22B). Une corrélation significative ( $R = 0,90$ ,  $p < 0,001$ , pente =  $3,36 \pm 0,34$ ) est observée entre l'augmentation du seuil de sensibilité et l'augmentation de la masse corporelle.

L'effet des essais répétés au cours d'une même journée est évalué en mesurant le seuil de nociception de la patte à des intervalles de 30 min pendant 2 h, le matin et l'après-midi. L'étude statistique ne montre aucune différence significative entre les 3 mesures consécutives pour chaque triplet, ni entre la patte gauche et la patte droite. Il n'y a aucun changement crucial des mesures entre le matin et l'après midi (Figure 23A). Étant donné qu'aucune différence significative n'est observée entre les 3 mesures consécutives pour chaque triplet, toutes les autres analyses sont faites en utilisant la valeur moyenne des 3 mesures de pression.



**Figure 22. Evaluation du test de la pince Bioseb. A)** Seuil de sensibilité nociceptive mesuré avec la pince chez des rats naïfs pendant 9 jours; chaque jour la mesure a été répétée trois fois pour chaque patte. **B)** Prise de poids des mêmes rats au cours de l'expérimentation. Chaque symbole correspond à la moyenne de 4 rats ( $\pm$  erreur-type).



**Figure 23. Evaluation du test de la pince Bioseb. A)** Appliqué à intervalles de 30 min pendant 2 h, le test de la pince donne des résultats reproductibles au cours d'une même journée. **B)** Praticqué sur les mêmes rats successivement par deux utilisateurs différents, l'un expérimenté (A), l'autre naïf (B), le test de la pince donne les mêmes résultats.

## 1.2 Validation

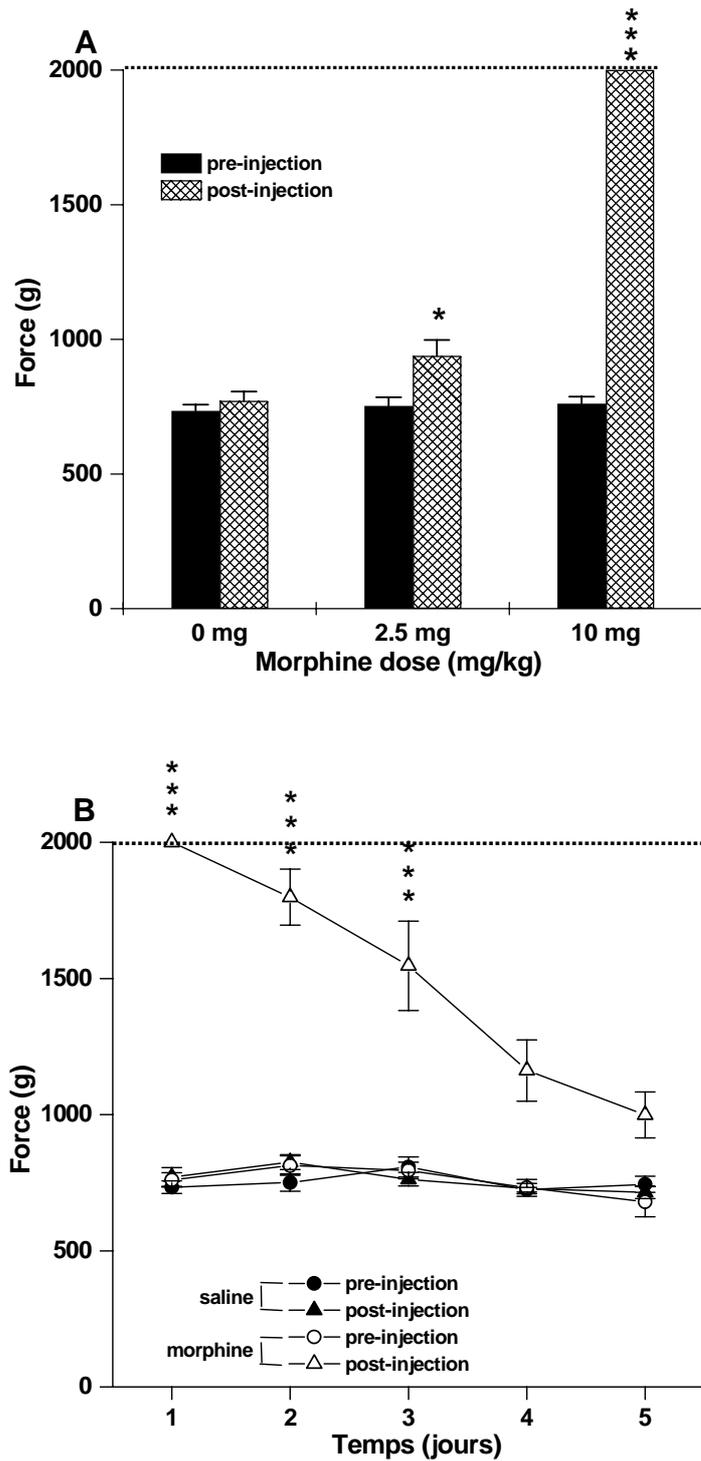
### 1.2.1 Reproductibilité entre investigateurs

Le seuil nociceptif de la patte est mesuré par deux expérimentateurs pendant 4 jours sur chaque patte du même groupe d'animaux ( $n = 5$ ). Un expérimentateur est naïf (*B*), tandis que l'autre est la personne qui pratique habituellement ce test (*A*). Les deux sessions indépendantes sont séparées par 30 min et l'ordre des expérimentateurs est modifié chaque jour. L'étude statistique ne montre aucune différence significative entre les résultats des deux expérimentateurs (Figure 23B).

### 1.2.2 Application de la pince Bioseb: étude des effets analgésiques de la morphine

Un effet analgésique dépendant de la dose de morphine est révélé lors des tests effectués 30 min après l'injection (Figure 24A). La limite supérieure de la force appliquée sur la patte, limitée volontairement à 2000 g, est atteinte lors de toutes les mesures effectuées à la dose de 10 mg/kg (Figure 24A et B).

L'induction de la tolérance à la morphine est étudiée par son administration sous-cutanée quotidienne de 10 mg/kg pendant 5 jours (Figure 24B). Le seuil nociceptif mécanique est mesuré chaque jour juste avant et 30 min après l'administration de morphine. Le jour 1, le seuil de pression de la patte atteint la limite supérieure de 2000 g. L'étude statistique à quatre facteurs du traitement (morphine/milieu salin), du temps (1, 2, 3, 4 et 5 jours), de l'injection (pré/post) et de la patte (gauche/droite), confirme l'absence de différence entre les valeurs de la patte gauche et de la patte droite. Il existe un effet significatif de l'interaction entre les facteurs *injection*, *temps* et *traitement* ( $F_{4,24} = 4,82$ ,  $p = 0,006$ ). Les valeurs obtenues juste avant l'injection de morphine ne sont pas différentes des valeurs contrôle et ne montrent aucune différence significative au cours des 5 jours. Après injection de morphine le seuil nociceptif diminue progressivement au cours du traitement de 5 jours (Figure 24B) mais ces valeurs restent significativement plus élevées que celles du groupe témoin pendant les 3 premiers jours (Figure 24B). Une analyse de régression linéaire sur les jours 2 à 5 confirme une diminution significative ( $R = -0,98$ ,  $p = 0,015$ ) de l'analgésie avec le temps, et donc la mise en place d'une tolérance à la morphine.



**Figure 24. Effets analgésiques de la morphine. A)** Le seuil de sensibilité à un stimulus mécanique nociceptif, mesuré avec la pince Bioseb, augmente avec la dose de morphine injectée. Moyenne  $\pm$  erreur-type (n = 4). **B)** Après injection de morphine, le seuil de sensibilité nociceptive dépasse la limite de mesure le premier jour de l'expérience. Ce seuil décroît progressivement lorsque l'injection de morphine est répétée quotidiennement. Les lignes horizontales pointillées correspondent à la limite supérieure fixée à 2000 g. Moyenne  $\pm$  erreur-type (n = 4 rats par groupe).

## 2. Modèle carragénine, modèle de douleur soutenue

### 2.1 Caractérisation de l'inflammation

- Volume de l'œdème

L'œdème atteint un volume maximal 5 à 6 h après l'injection de carragénine à 3% dans la patte postérieure droite (Figure 25A). Au cours des 24 premières heures, l'étude statistique montre une interaction significative des 3 facteurs, *traitement*, *temps* et *côté* ( $F_{8,48} = 55,0$ ,  $p < 0,001$ ). Pendant cette phase précoce, l'œdème est significatif dès 3 h après l'injection et maintient son niveau maximum jusqu'à 24 h. Aucun changement de volume n'est observé dans le groupe témoin ou dans la patte controlatérale de tous les groupes ( $n = 4$  rats par groupe).

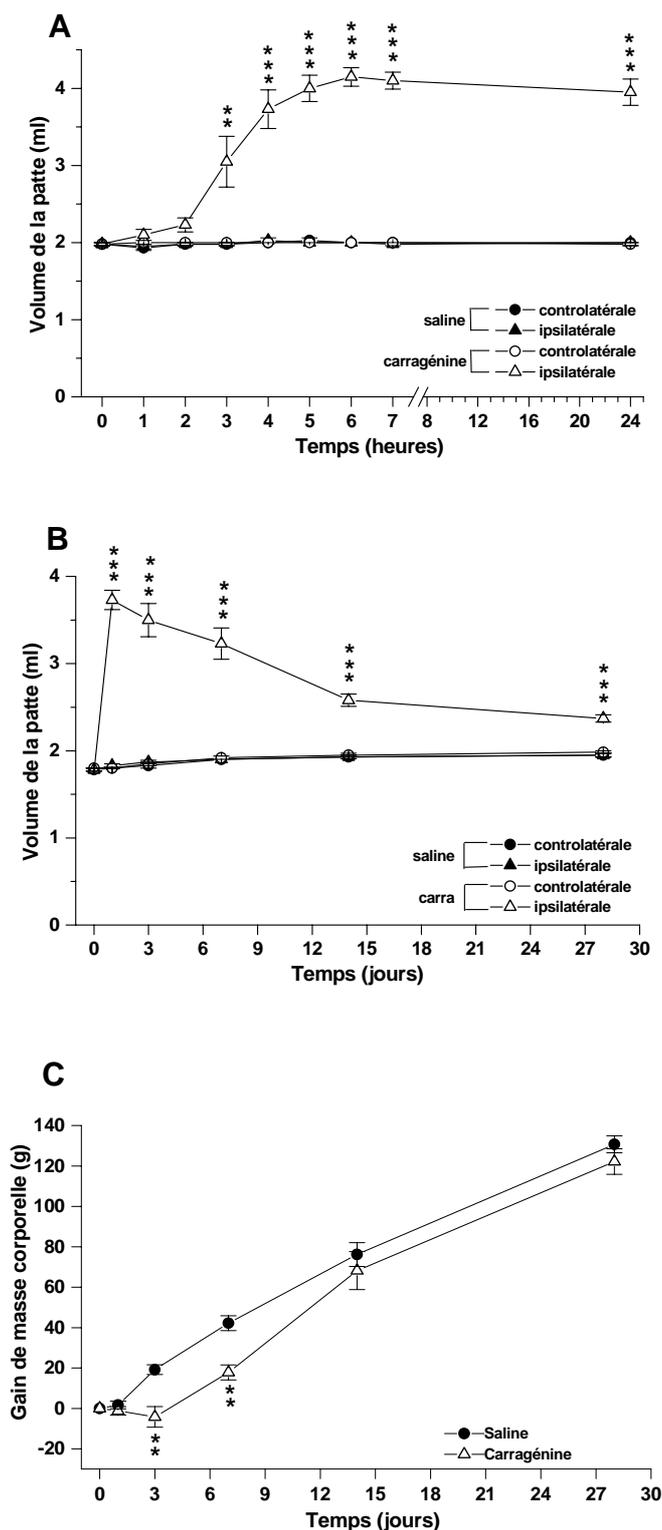
Pour le stade tardif (étude sur un autre groupe de 6 rats), l'analyse statistique montre une interaction significative des facteurs *temps*, *traitement* et *côté* ( $F_{5, 50} = 97,23$ ,  $p < 0,001$ ). Après injection de carragénine à 3 % dans la patte postérieure droite du rat, l'œdème développé dès les premières heures est encore présent au jour 1, et diminue progressivement (Figure 25B). Après 28 jours, le volume de la patte reste encore significativement plus élevé que celui des animaux témoins ( $p < 0,001$ ). Aucun changement de volume n'est observé concernant les pattes postérieures du groupe contrôle ou la patte controlatérale du groupe traité.

- Augmentation de la masse corporelle

Les rats ayant reçu de la carragénine montrent un ralentissement du gain de masse pendant les 3 premiers jours après le traitement (Figure 25C), avec pour résultat une différence de poids significative (interaction *traitement* x *temps*,  $F_{5, 50} = 3,88$ ,  $p < 0,005$ ) par rapport au groupe témoin pendant 7 jours. Par la suite, ce retard dans la prise de poids est compensé, et le groupe traité à la carragénine ne présente plus de différence significative avec le groupe témoin.

- MPO

L'activité MPO, marqueur de l'inflammation, augmente progressivement dans la patte ayant subi une injection de carragénine et atteint une valeur maximale à 24 h (Figure 26A). L'activité MPO de la patte traitée diminue ensuite, plus rapidement que l'œdème, et retourne



**Figure 25. Caractérisation de l'inflammation après injection de carragénine.** Le volume de la patte atteint un maximum 6 h après l'injection (**A**) puis diminue petit à petit pendant la phase tardive (**B**) sans toutefois revenir à son niveau initial après 28 jours. **C**) Les rats ayant reçu une injection de carragénine présentent un retard dans la prise de poids pendant la première semaine de l'expérimentation (mêmes animaux que dans **B**).

aux valeurs de base dès le troisième jour (Figure 26B). La valeur à 24 h diffère significativement des autres ( $n = 5$ ,  $p = 0.034$ ).

## 2.2. Seuil nociceptif dans le modèle carragénine

### 2.2.1 Test de la pince calibrée Bioseb

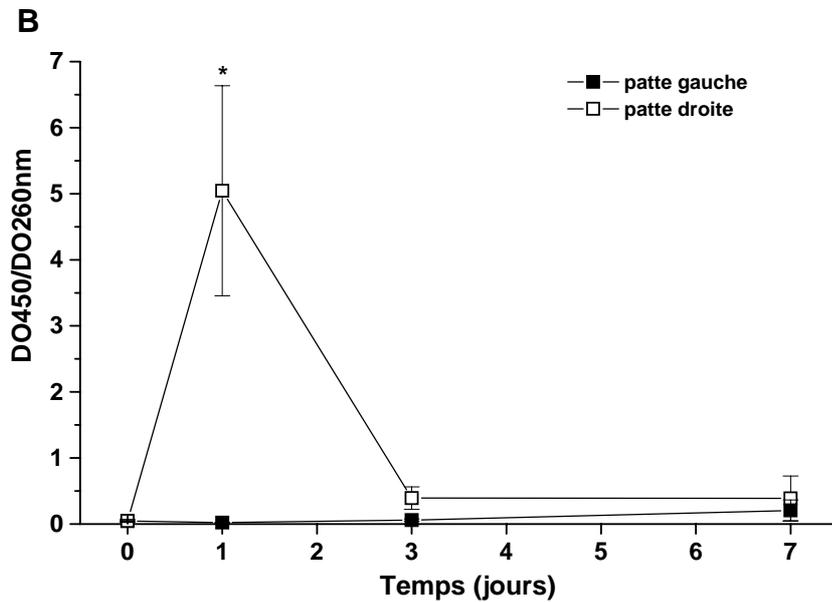
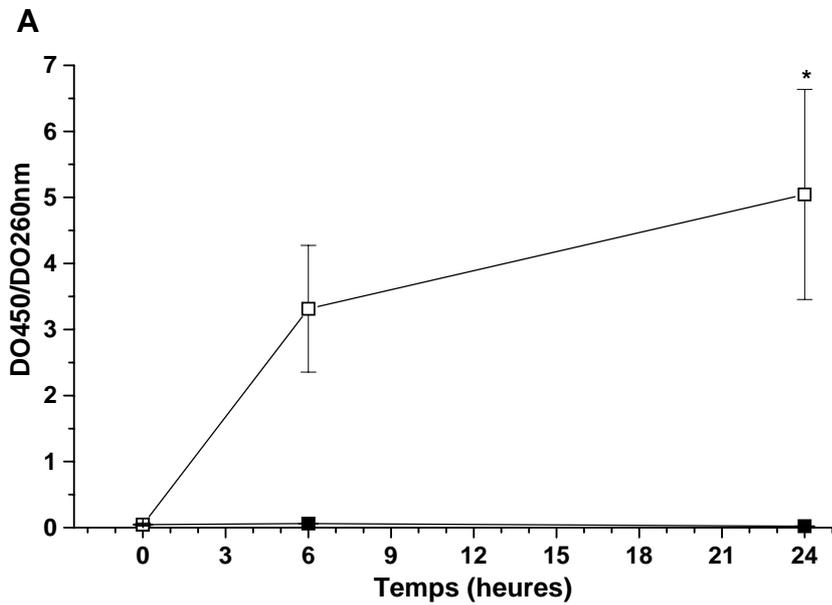
Dans la phase précoce (Figure 27A), le traitement par la carragénine provoque une diminution significative du seuil de réponse à la stimulation mécanique nociceptive par rapport au groupe témoin ( $n = 4$  rats par groupe). L'analyse statistique montre une interaction significative des 3 facteurs *traitement*, *temps* et *côté* ( $F_{8,48} = 6,89$ ,  $p < 0,001$ ). Cette diminution est significative dès 2 h et la valeur de seuil minimale (allodynie mécanique) est atteinte 6 h après l'injection. L'hyperalgésie mécanique est encore présente à 24 h après l'injection de carragénine.

Dans la phase tardive (Figure 27C), la mesure du seuil de pression mécanique révèle une interaction significative des facteurs *traitement*, *temps* et *côté* ( $F_{5,50} = 7,93$ ,  $p < 0,001$ ,  $n = 6$  rats par groupe). L'inflammation induite par la carragénine produit une diminution significative du seuil pendant 7 jours. Aucun effet significatif n'est observé chez le groupe témoin.

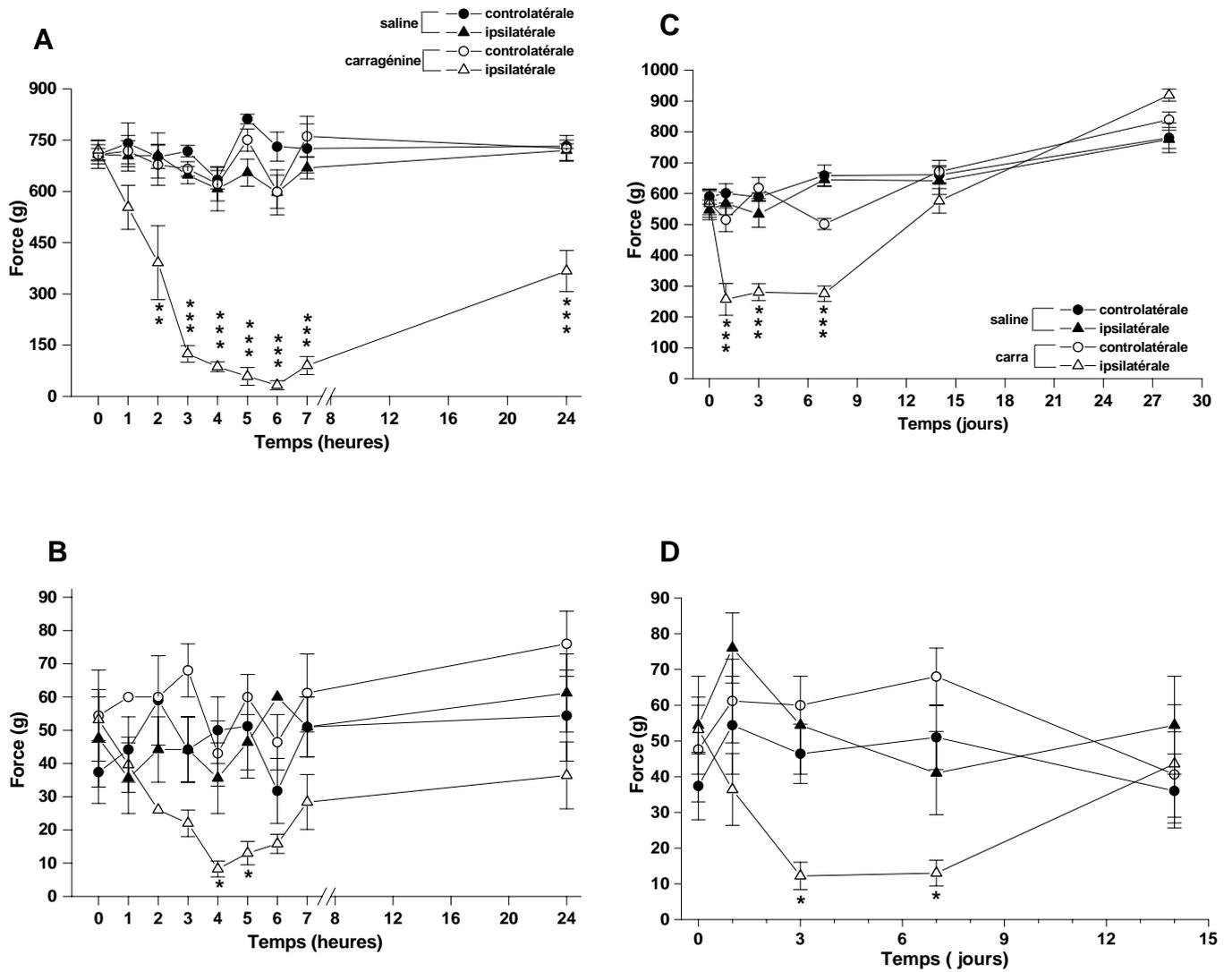
### 2.2.2 Test des filaments de von Frey

Nous avons employé les filaments de von Frey comme dispositif de comparaison avec la pince calibrée. Pendant la phase précoce (Figure 27B), l'analyse statistique à trois facteurs ( $n = 5$  rats par groupe) montre des effets significatifs d'un côté par rapport à l'autre ( $F_{1,6} = 8,78$ ,  $p = 0,025$ ) en fonction du temps ( $F_{8,48} = 2,80$ ,  $p = 0,012$ ). Le seuil moyen de retrait de la patte ipsilatérale est significativement inférieur à celui de la patte controlatérale 4 et 5 h après injection de carragénine. Aucune différence significative n'est observée dans le groupe témoin.

Pendant la phase tardive (Figure 27D) on observe, aux 3<sup>e</sup> et 7<sup>e</sup> jours après l'injection de carragénine, une diminution significative ( $F_{1,8} = 19,55$ ,  $p = 0,002$ ) du seuil de pression mécanique de la patte ipsilatérale, par rapport à la patte controlatérale et par rapport au groupe témoin. Aucun effet significatif n'est observé chez le groupe témoin.



**Figure 26.** L'activité de la MPO (exprimée par la valeur de DO à 450nm proportionnelle à l'activité enzymatique de la MPO dans l'échantillon par rapport à la DO à 260nm, proportionnelle à la quantité d'ADN dans le même échantillon) augmente pendant la phase précoce de l'inflammation, après l'injection de carragénine, puis retrouve son niveau de base après 3 jours. Moyenne  $\pm$  erreur-type (n = 5 rats par groupe).



**Figure 27. Seuil nociceptif à la pression mécanique après injection de carragénine.** Le test de la pince (en haut) et le test des filaments de von Frey (en bas) ont été comparés pendant la phase précoce (à gauche) et pendant la phase tardive (à droite) de l'inflammation. Dans les deux cas, une hyperalgie mécanique est observée dès les premières heures et se poursuit pendant une semaine. Le test de la pince semble plus sensible que le test de Von Frey pour mettre cette hyperalgie en évidence.

### 2.2.3 « Plantar Test »

Les valeurs obtenues avec le « Plantar test » (Figure 28), 24 h après l'injection, montrent une diminution significative de la latence du retrait de la patte ipsilatérale, par rapport à la patte controlatérale et par rapport au groupe témoin ( $F_{5,50} = 5.23$ ,  $p < 0.001$ , test de Tukey). Aucune différence significative n'est observée entre les deux pattes des rats témoins.

## 2.3 Facteurs de transcription : expression et immunocytochimie des protéines FosB

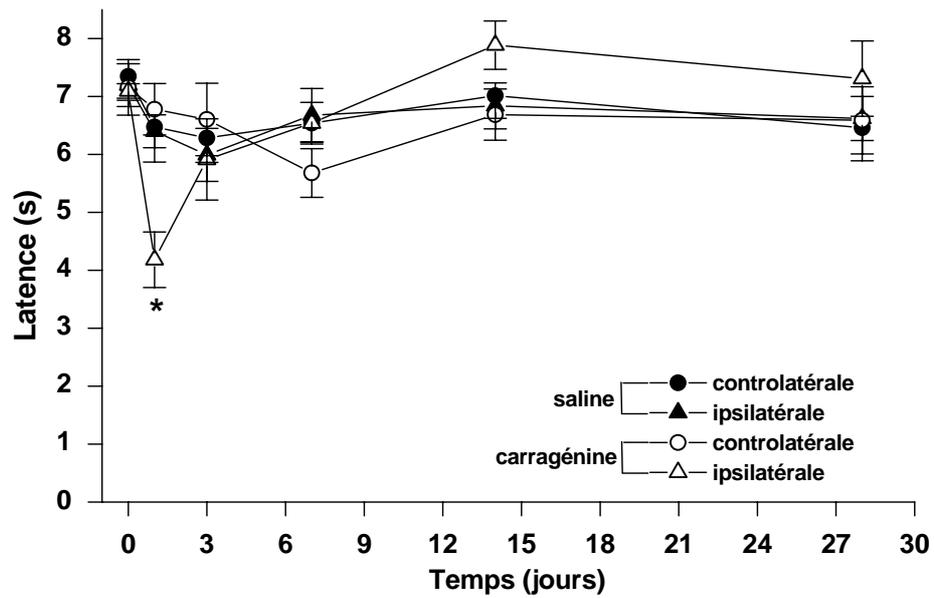
Mise en forme : Puces et numéros

### 2.3.1 Répartition de FosB-LI dans la moelle épinière

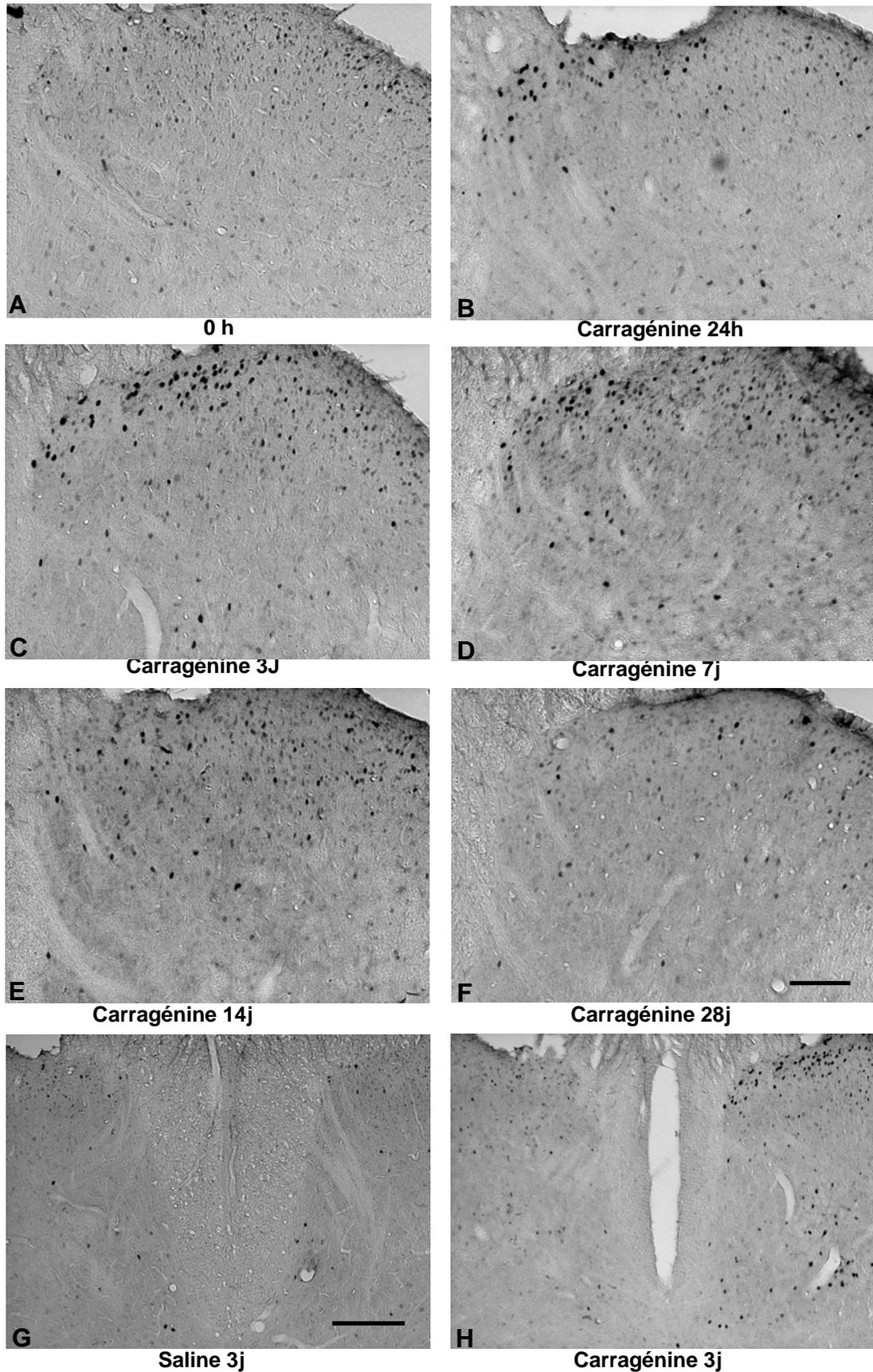
Le marquage de FosB-LI est localisé dans les noyaux des cellules immunoréactives à ce facteur. On le trouve dans les laminae I et II (couches superficielles) ainsi que dans les couches profondes de la corne dorsale (Figures 29). Dans les couches superficielles le marquage est plus intense dans la zone correspondant aux projections des afférences primaires de la patte du rat. Dans les couches profondes le marquage est plus diffus.

Chez les rats naïfs ( $n = 5$ ) la densité d'expression de FosB-LI dans la corne dorsale est en moyenne de l'ordre de 18 cellules par coupe. Dans les couches superficielles (Figures 31) le nombre de cellules FosB-LI est significativement inférieur (environ la moitié) au niveau du segment L4 ( $p = 0,025$ ). Il n'y a pas de différence entre les deux côtés de la moelle. Dans les couches profondes aucune différence significative n'est observée entre les segments spinaux, ni entre les deux côtés (Figures 31B).

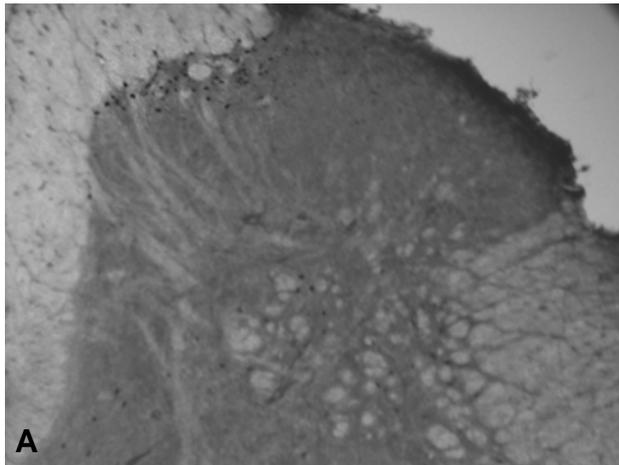
Pour déterminer la spécificité du marquage FosB-LI, nous avons comparé les immunoréactivités FosB-LI (Figure 29) et FosB-spécifique (Figure 30) dans les couches superficielles et dans les couches profondes au niveau du segment L4 de la moelle épinière. Pour cela, nous avons suivi l'évolution du marquage avec le temps après traitement à la carragénine. Un marquage important (environ 35 cellules par coupe) de cellules immunoréactives à FosB spécifique est observé 8 h après l'injection de carragénine (Figure 30A). Un faible marquage subsiste à 24 h et aucun marquage significatif n'est discernable les jours suivants. En revanche, le marquage de FosB-LI reste significatif plus d'une semaine après l'injection (Figure 29). Ce contrôle indique que l'immunoreactivité de FosB spécifique ne contribue pas au marquage FosB-LI à partir de 1 jour après l'injection de carragénine.



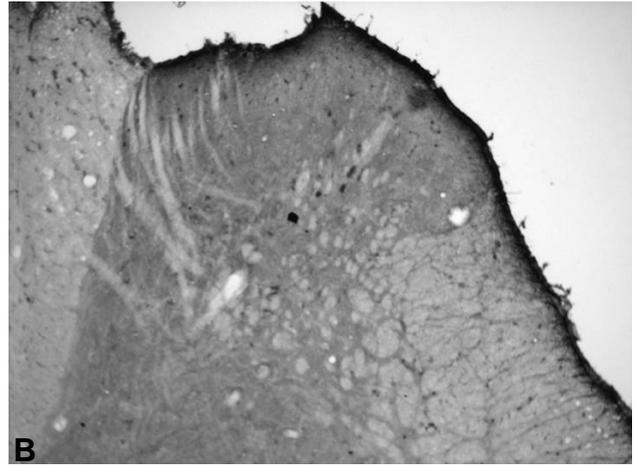
**Figure 28.** La latence de retrait de la patte a été mesurée avec le « Plantar test », pendant la phase tardive de l'inflammation consécutive à l'injection de carragénine. A 24 h on observe un abaissement du seuil de sensibilité nociceptive à un stimulus thermique chaud de la patte traitée. Moyenne  $\pm$  erreur-type (n = 6 rats par groupe).



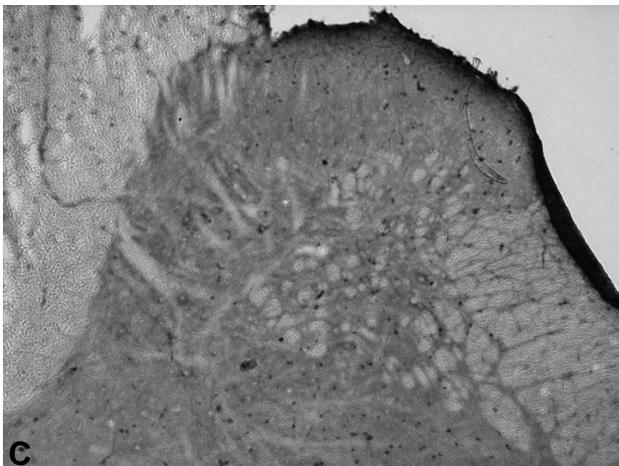
**Figure 29.** A-F. Evolution au cours du temps de l'immunoréactivité FosB/ $\Delta$ FosB au niveau L4, après injection de carragénine. Echelle : 100  $\mu$ m. G-H. 3 jours après l'injection, le marquage est augmenté du côté ipsilatéral dans le groupe carragénine, mais pas dans le groupe témoin. Echelle : 200  $\mu$ m.



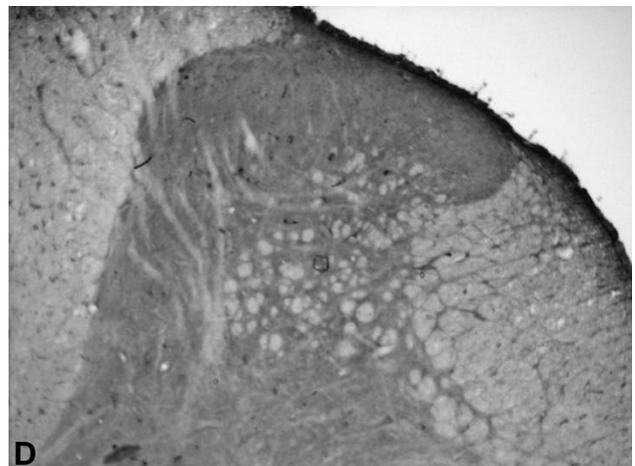
**A**  
Carra 8 h



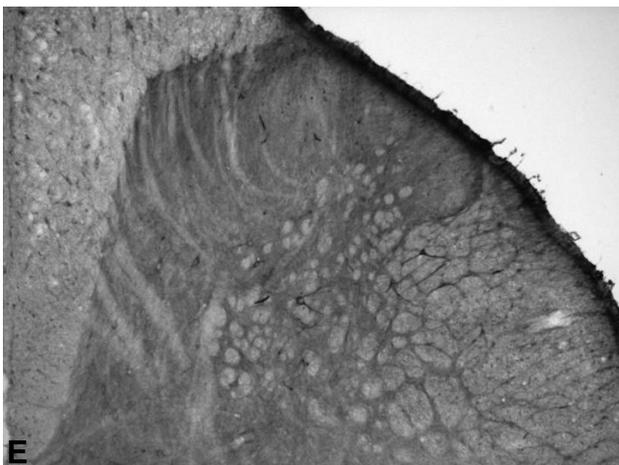
**B**  
Carra 24 h



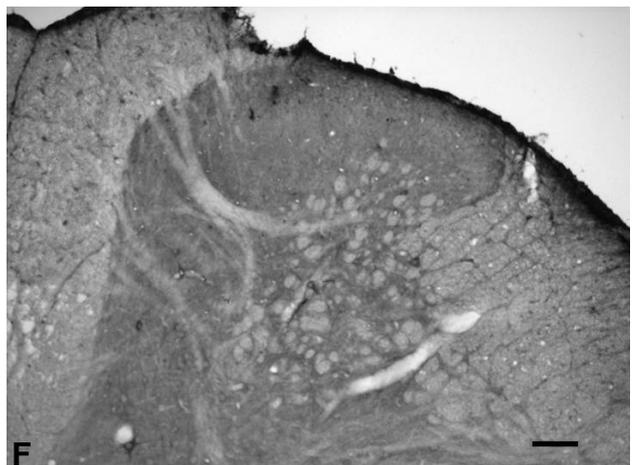
**C**  
Carra 3 jours



**D**  
Carra 7 jours

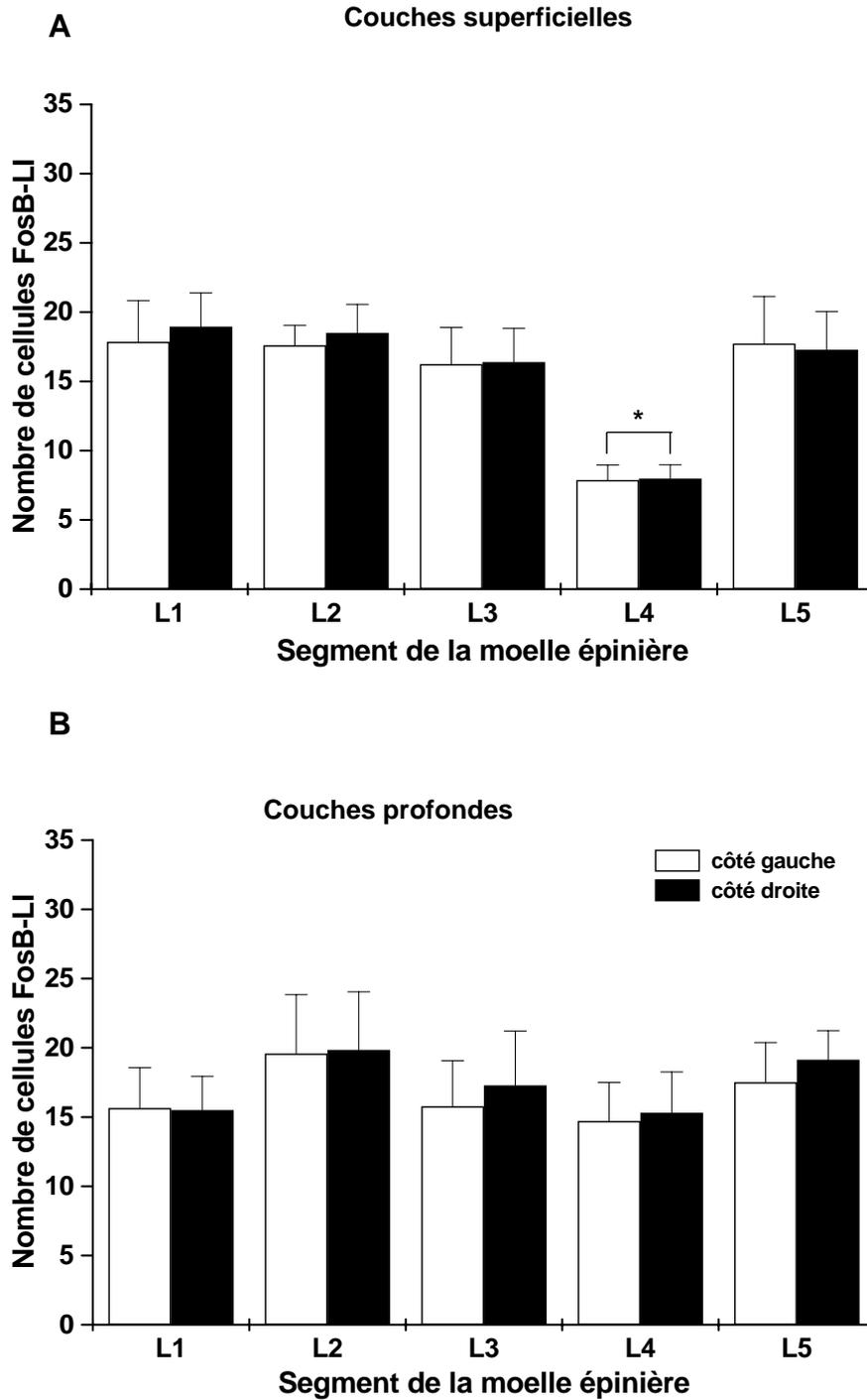


**E**  
Carra 14 jours



**F**  
Carra 28 jours

**Figure 30.** 8 h après injection de carragénine, on observe dans les couches superficielles, au niveau L4, une forte immunoréactivité FosB spécifique qui disparaît après 24 h. Barre d'échelle (A-F) : 100  $\mu$ m.



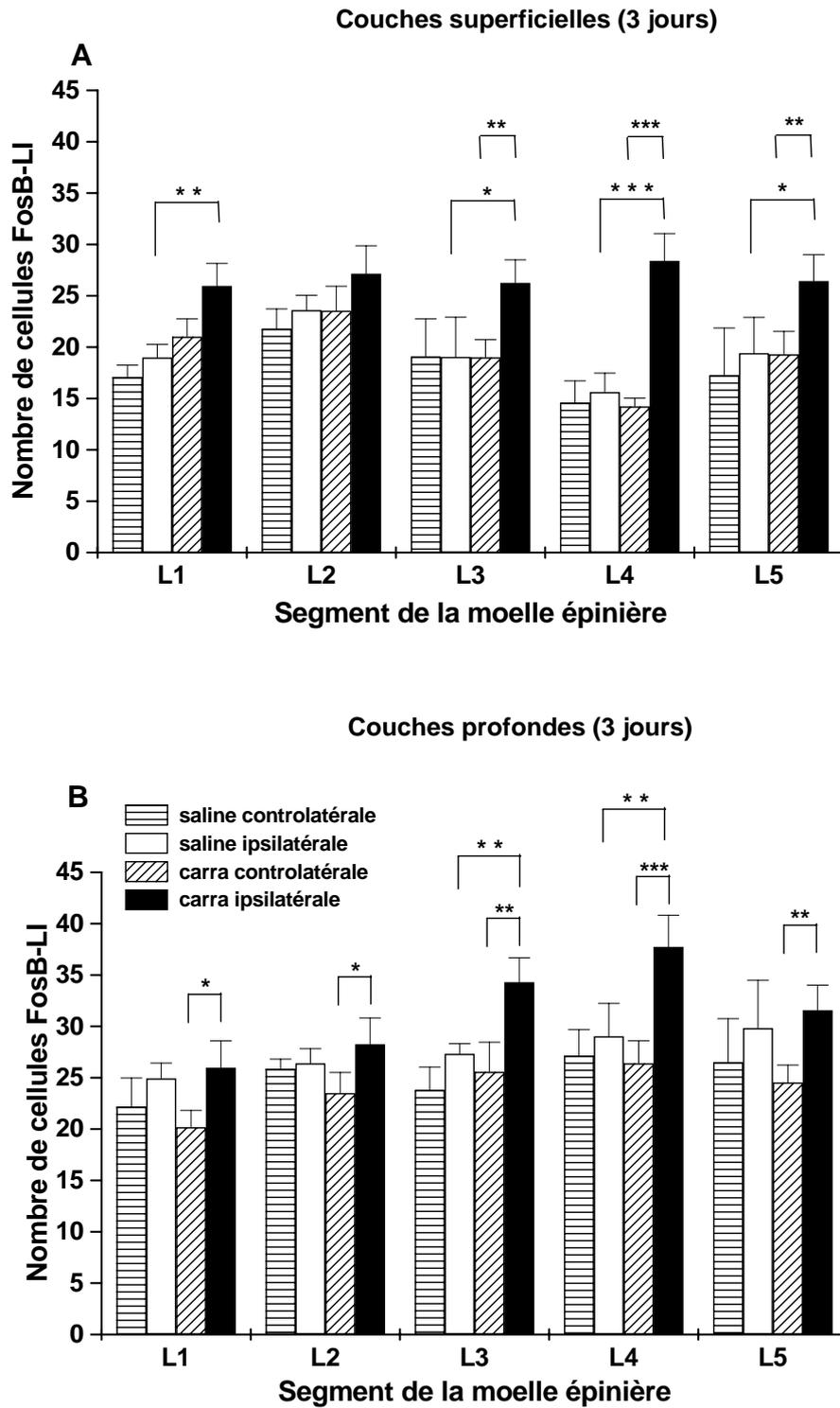
**Figure 31.** Niveau de base de l'immunoréactivité de FosB/ $\Delta$ FosB (FosB-LI) dans la région lombaire de la moelle épinière mesurée chez des rats naïfs dans les couches superficielles (A) et dans les couches profondes (B). La densité de FosB-LI est uniforme le long de la moelle lombaire, sauf au niveau L4, dans les couches superficielles, où elle est moitié moindre. Moyenne  $\pm$  erreur type (n = 4 ou 5 selon les niveaux).

Le nombre de cellules FosB-LI a été mesuré 1, 3, 7, 14 et 28 jours après traitement (injection de carragénine ou de solution saline) dans les couches superficielles et dans les couches profondes de la corne dorsale de la moelle épinière, aux niveaux spinaux L1, L2, L3, L4, L5. Il n'a pas toujours été possible d'obtenir des coupes exploitables à tous les niveaux spinaux pour chacun des rats. Il y a ainsi des données manquantes, surtout aux niveaux L1 et L2. En fait, des séries complètes pour les 5 niveaux de coupe analysés (L1, L2, L3, L4, L5) n'ont été obtenues que pour 14 des 63 rats utilisés : 7 témoins (1 à 24 h, 3 à 3 jours, 2 à 7 jours, 1 à 14 jours) et 7 carragénine (2 à 24 h, 2 à 3 jours, 2 à 7 jours, 1 à 28 jours). Ce plan expérimental incomplet ne permet pas d'utiliser le niveau de coupe (L1-L5) comme facteur *intra-sujet* dans l'analyse des données. L'analyse globale a donc été faite en considérant comme indépendantes les 242 paires (gauche-droite) d'observations issues des 63 rats. Quatre facteurs ont été pris en compte : *traitement*, *temps* et *niveau spinal*, pris comme facteurs intergroupes, et *côté* comme facteur intra-groupe. L'analyse montre un effet significatif de chaque facteur et une interaction significative des facteurs *traitement* et *côté* avec le facteur *temps* ( $F_{4,192} = 3,18$ ,  $p < 0,015$ ) d'une part, et avec le facteur *niveau* ( $F_{4,192} = 6,00$ ,  $p < 0,001$ ) d'autre part.

Pour présenter les résultats de façon plus lisible, nous avons choisi d'illustrer l'évolution du marquage FosB-LI en fonction du temps, d'une part, au seul niveau L4, et en fonction du niveau spinal, d'autre part, à 3 jours. Les résultats sont donnés dans leur totalité en annexe, sous forme de tableaux (n°5-15) et de graphiques (n° 42-52).

A 3 jours, l'analyse en fonction des différents segments spinaux porte sur 6 rats témoins et 6 rats carragénine (50 observations indépendantes). Dans les couches superficielles l'analyse montre un effet significatif ( $F_{4,40} = 5,64$ ,  $p = 0,001$ ) de l'interaction entre les facteurs *traitement*, *niveau spinal* et *côté* (Figure 32A). Chez les rats traités à la carragénine, une augmentation ipsilatérale significative du nombre de marquages FosB-LI est observée dans les niveaux L3 à L5, principalement en L4 où les cellules immunoréactives sont environ 2 fois plus nombreuses que du côté controlatéral et que des 2 côtés du groupe témoin. L'augmentation relative est d'autant plus marquée en L4 que le niveau initial était plus faible.

L'analyse des couches profondes dans les différents segments spinaux montre un effet significatif ( $F_{1,40} = 30,49$ ,  $p < 0,001$ ) de l'interaction des facteurs *traitement* et *côté* (Figure 32B). Chez les rats traités à la carragénine, une augmentation ipsilatérale significative du nombre de marquages FosB-LI est observée à tous les niveaux, principalement en L4 par



**Figure 32.** Immunoréactivité de FosB-LI dans la région lombaire de la moelle épinière mesurée dans les couches superficielles (A) et dans les couches profondes (B) 3 jours après injection de carragénine ou de solution saline. Une augmentation significative du marquage est observée du côté ipsilatéral dans les deux régions pour le groupe carragénine.

rapport au marquage controlatéral. Une différence significative est observée en L3 et L4 par rapport au marquage bilatéral du groupe témoin. Les augmentations sont plus faibles que dans les couches superficielles.

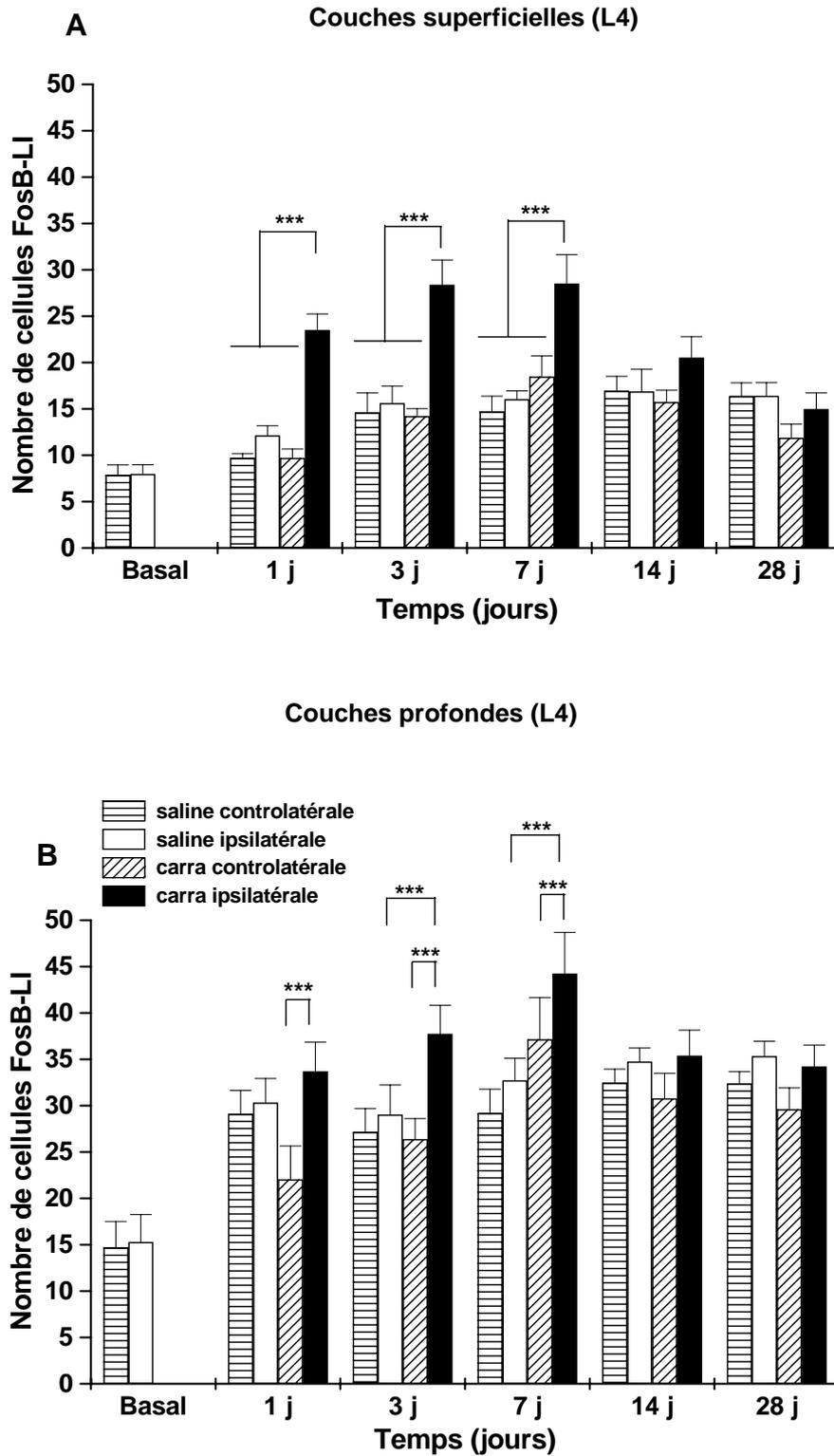
Nous décrivons également l'effet de la carragénine en fonction du temps pour le segment L4, cible principale des afférences nociceptives de la patte, où les effets des conditions expérimentales sont les plus marqués (Figure 33).

L'analyse des couches superficielles et des couches profondes de L4 au cours de temps est basée sur 64 observations issues de 5 rats naïfs, 29 rats témoins et 30 rats carragénine. Dans les couches superficielles, elle montre un effet significatif ( $F_{5,54} = 5,87$ ,  $p < 0,001$ ) de l'interaction des facteurs *traitement*, *temps* et *côté* (Figure 33A). L'inflammation induite par la carragénine provoque, depuis 1 jour jusqu'à 7 jours après l'injection, une augmentation significative du nombre de marquages FosB-LI du côté ipsilatéral par rapport au marquage controlatéral ( $p = 0,0001$ , Figure 29H) ainsi que par rapport au marquage bilatéral des rats témoins ( $p = 0,032$ ).

Dans les couches profondes de L4, on observe au cours du temps un effet significatif ( $F_{5,54} = 5,79$ ,  $p < 0,001$ ) de l'interaction des facteurs *traitement*, *temps* et *côté* (Figure 33B). L'inflammation induite par la carragénine provoque une augmentation significative du nombre de marquages FosB-LI du côté ipsilatéral, depuis 24 h jusqu'à 7 jours après l'injection, par rapport au marquage controlatéral, ainsi que par rapport au marquage bilatéral des rats témoins (aux jours 3 et 7,  $p = 0,001$ ).

Notons aussi une augmentation significative du marquage au cours du temps dans les deux couches des animaux témoins et du côté controlatéral des animaux traités à la carragénine, par rapport à la valeur obtenue dans les deux pattes des rats naïfs (5 rats naïfs,  $p = 0,032$  dans les couches superficielles et  $p = 0,001$  dans les couches profondes ; par souci de clarté, cette différence statistique n'est pas indiquée dans les figures 33A et 33B). En revanche, il n'existe pas de différence significative entre les pattes des rats témoins et la patte controlatérale des rats traités.

← Mise en forme : Puces et numéros



**Figure 33.** Evolution au cours du temps de l'immunoréactivité FosB-LI dans les couches superficielles (A) et dans les couches profondes (B) au niveau du segment L4 de la moelle épinière. Dans les deux régions une augmentation ipsilatérale du marquage est observée dans le groupe carragénine durant la première semaine après l'injection.

### **3. nNOS et douleur inflammatoire**

#### **3.1 Répartition de nNOS dans la moelle épinière chez les rats naïfs**

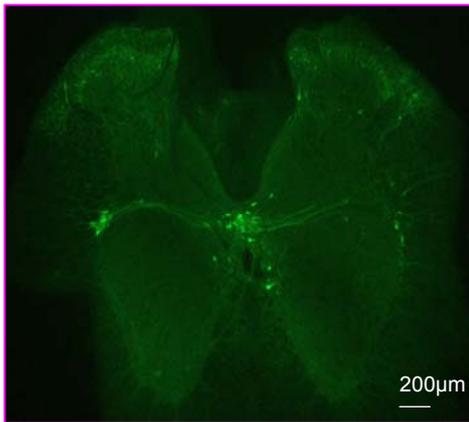
L'observation d'une coupe de moelle épinière chez le rat naïf (Figure 34Aa) montre que le marquage en immunofluorescence de nNOS est essentiellement concentré dans les lamine II et X, et dans la colonne intermédiolatérale (IML). Le marquage de la lamina II (Figure 34Ab) concerne à la fois des fibres et des corps cellulaires de petite taille (~10  $\mu$ m) répartis de manière uniforme. Les prolongements qui prennent naissance à partir de ces corps cellulaires montrent fréquemment une orientation dorsoventrale perpendiculaire à la couche II. Le nombre moyen de neurones dans les couches superficielles est de l'ordre de 14 par coupe. Quelques cellules marquées, plus rares que dans la couche II, sont dispersées dans les couches profondes. Le marquage de la lamina X (Figure 34Ad) est moins diffus. Il est concentré dans des corps cellulaires de taille plus importante que ceux de la lamina II (~15-30  $\mu$ m), ainsi que dans des prolongements bien visibles. Le marquage de l'IML montre une densité élevée de corps cellulaires de taille comparable à ceux de la lamina X. Un faisceau de prolongements cellulaires bien identifiés relie l'IML à la lamina X. Des cellules immunofluorescentes sont également discernées le long de la face médiane de la corne dorsale entre les lamine II et X (Figure 34Ac). Leurs corps cellulaires présentent une taille comparable à ceux de la lamina X.

Des études immunocytologiques ponctuelles, réalisées avec un anticorps dirigé contre le  $\beta$ -dystroglycane (don du Dr A. Rendon) marquant les pieds astrocytaires, montrent que les fibres immunoréactives à nNOS qui entourent les vaisseaux peuvent s'insérer entre les pieds astrocytaires et l'assise endothéliale (Figure 34B).

#### **3.2 nNOS dans le modèle inflammatoire**

##### **3.2.1 nNOS simple marquage**

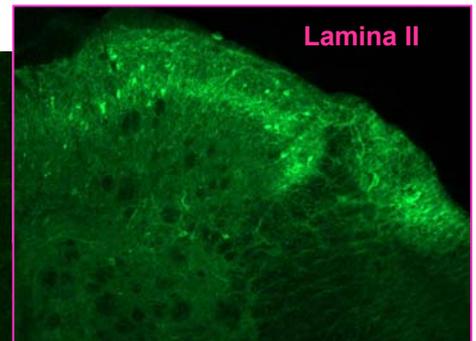
Nous avons étudié le marquage de nNOS au cours du temps dans deux modèles de douleur inflammatoire, utilisant respectivement carragénine et zymosan. Dans les deux cas, le traitement ne modifie pas significativement le nombre et la répartition des neurones nNOS dans la couche II de la moelle épinière (Figure 35) : le nombre de cellules marquées était respectivement de  $14,4 \pm 0,3$  (ipsi) et  $13,4 \pm 0,2$  (contra) dans le groupe carragénine, et de  $14,0 \pm 0,2$  (ipsi) et  $14,2 \pm 0,2$  (contra) dans le groupe témoin (n = 4 rats par groupe).



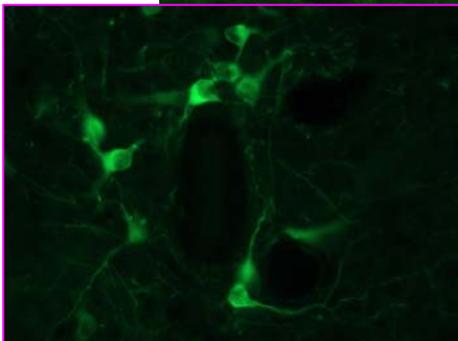
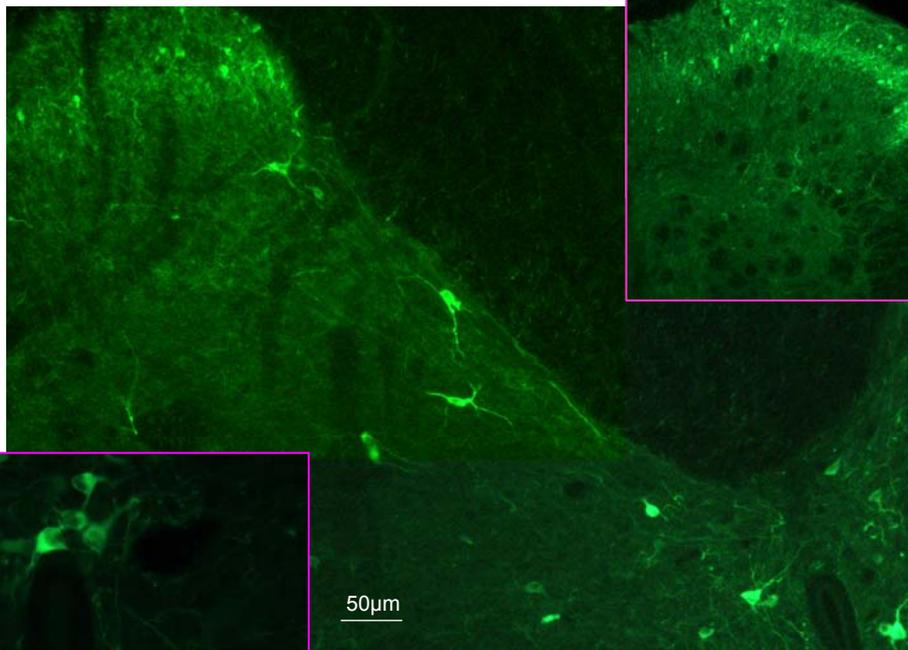
**A** Répartition de nNOS dans la moelle épinière

a. Vue globale

b. Corne dorsale

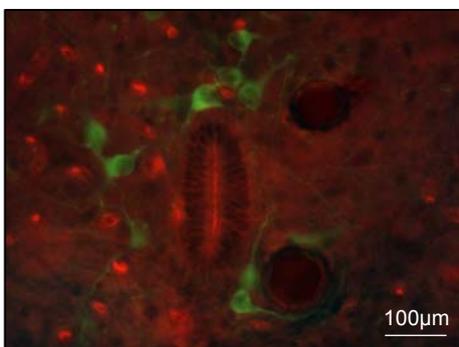


c



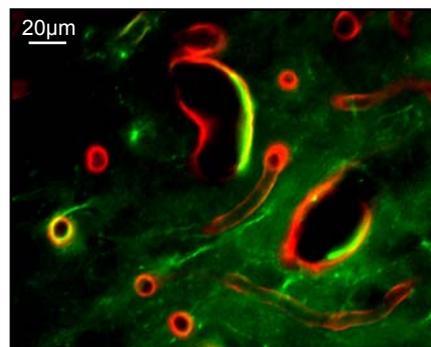
d. Lamina X

**C**



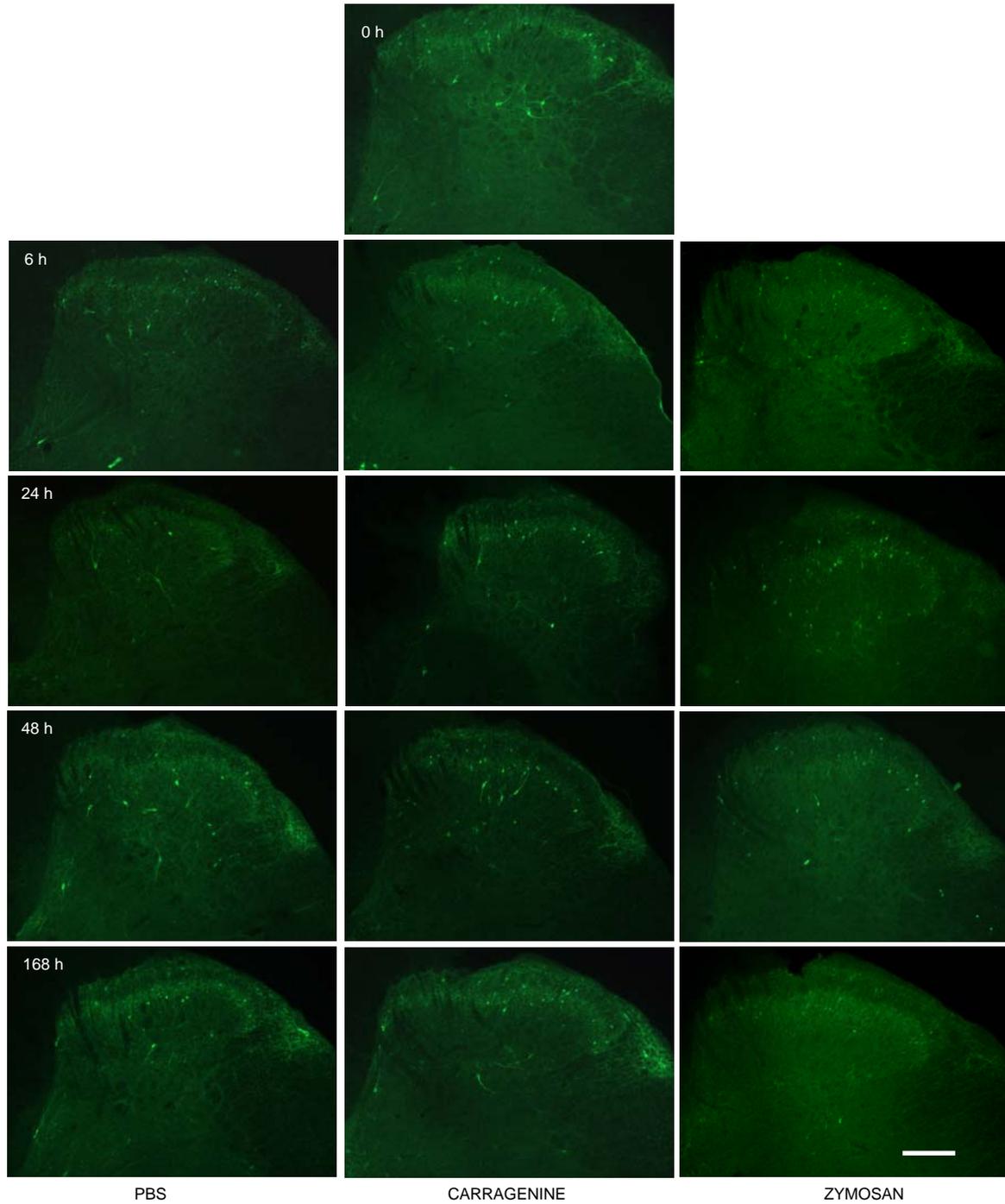
GLUT-1/nNOS

**B**



nNOS /  $\beta$ -Dystroglycan

**Figure 34.** A. Répartition de nNOS dans la moelle épinière. B. Double marquage nNOS (vert) et  $\beta$ -dystroglycan (rouge) dans l'IML. C. Double marquage nNOS (vert) et transporteur de glucose GLUT-1 dans la lamina X (même champ que Ad).



**Figure 35. Immunofluorescence de nNOS au cours du temps** après injection intraplantaire de PBS, de carragénine ou de zymosan. Barre d'échelle : 200  $\mu$ m.

Le zymosan n'ayant été utilisé que dans cette étude, nous avons vérifié l'effet de son injection sous-cutanée sur la nociception en utilisant le test de Randall et Selitto. Après une série de stimulations destinées à habituer les rats aux manipulations et avant toute injection, le groupe témoin et le groupe zymosan (n = 3 chacun) présentent un seuil de pression moyen de 300 g pour les deux pattes. Pour le groupe zymosan on observe dans les deux pattes une diminution significative (p = 0,009) du seuil de pression mécanique après l'injection ; il existe également une différence significative entre la patte ipsilatérale et la patte controlatérale (p = 0,048), mais il n'y a pas d'effet significatif de l'interaction entre les deux facteurs. L'injection intraplantaire de PBS ne provoque aucune modification significative du seuil de sensibilité des deux pattes postérieures (Figure 36).

### 3.2.2 nNOS double marquage

#### 3.2.2.1 nNOS/GLUT-1

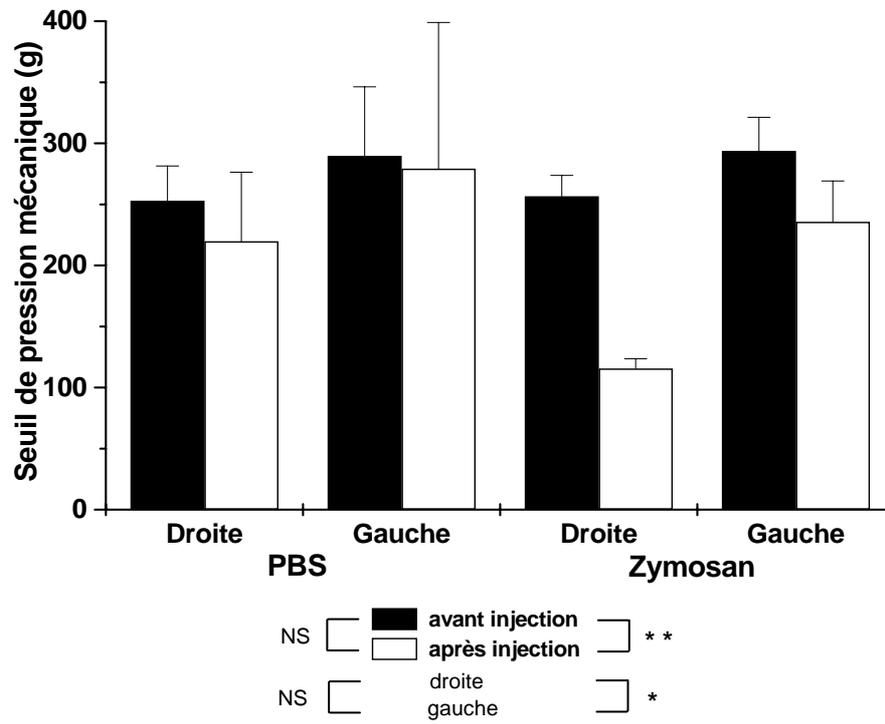
Le double marquage nNOS/GLUT-1 (Figure 34C) montre que les vaisseaux sanguins sont souvent entourés par des fibres immunoréactives nNOS. C'est le cas en particulier des vaisseaux de grande taille de la lamina X. Ces vaisseaux sont pourvus d'une paroi épaisse qui n'est pas marquée par le GLUT-1, correspondant vraisemblablement à une assise musculaire. Cette répartition rappelle celle qui est décrite dans le cortex cérébral.

#### 3.2.2.2 Marquages nNOS et famille Fos

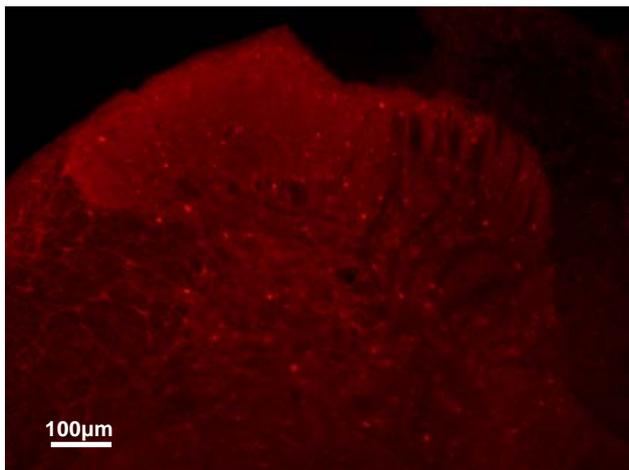
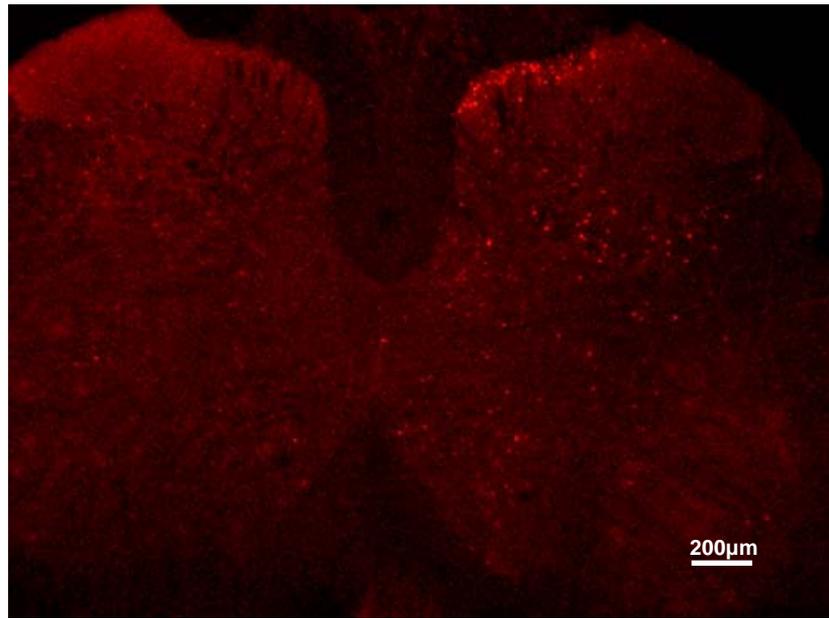
- Double marquage nNOS/c-Fos

Nous avons étudié le marquage de c-Fos uniquement sur le modèle de la carragénine. L'immunomarquage de c-Fos est présent 3 h après l'injection de carragénine. Les cellules immunoréactives à c-Fos sont principalement réparties dans la partie médiane des couches superficielles de la moelle épinière et un peu plus dispersées dans les couches profondes. Le nombre de noyaux immunoréactifs à c-Fos est plus élevé du côté ipsilatéral à l'injection (Figure 37). L'allure générale de la répartition du marquage c-Fos ressemble à celle du marquage nNOS dans la corne dorsale. En revanche, il n'existe pas de marquage significatif de c-Fos dans la lamina X et dans l'IML.

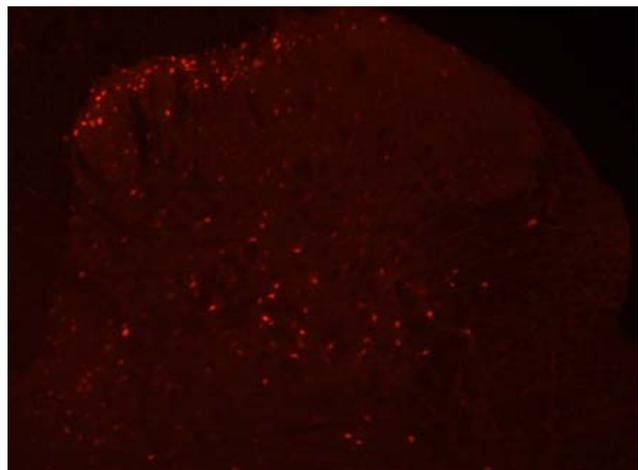
Le double marquage de nNOS et c-Fos 3 h après l'injection de carragénine dans les couches superficielles de la moelle épinière (Figure 38) montre des cellules exprimant à la fois des marquages pour c-Fos (nucléaire) et pour nNOS (cytoplasmique). Ce double marquage affecte la majorité des corps cellulaires immunoréactifs à nNOS et environ ¼ des



**Figure 36.** Test de Randall et Selitto avant et après injection intraplantaire de PBS ou de zymosan. Moyenne  $\pm$  erreur type (n = 3).

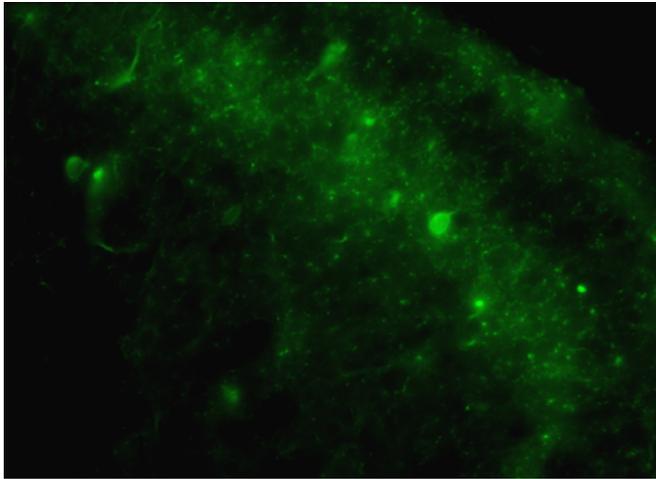


Côté controlatéral

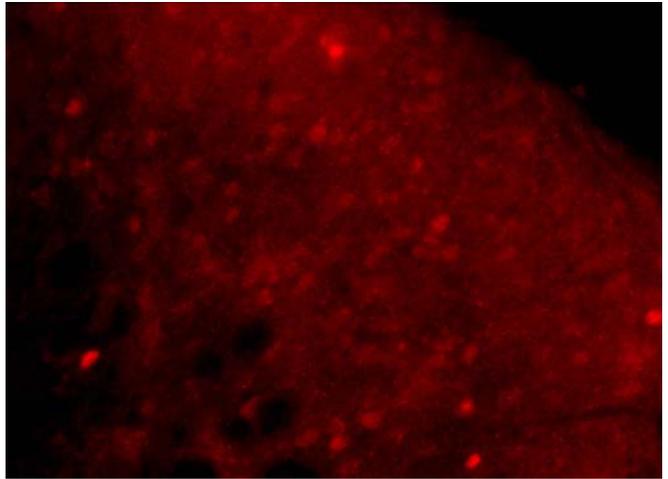


Côté ipsilatéral

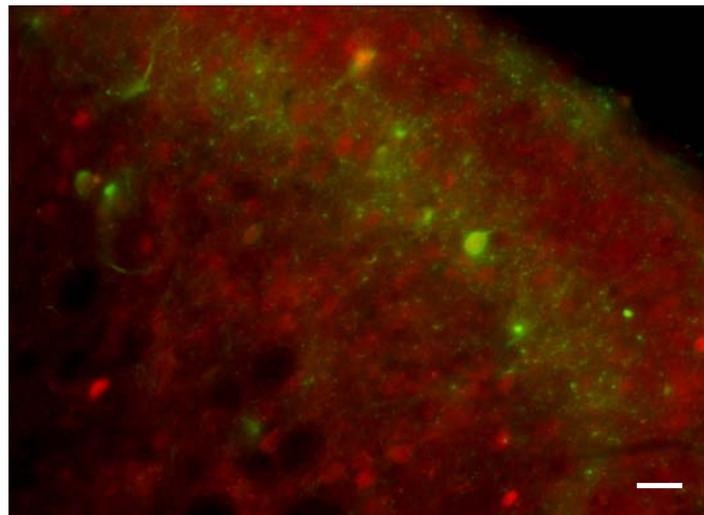
**Figure 37. Immunofluorescence de c-Fos** dans la région lombaire de la moelle épinière, 3 h après l'injection intraplantaire de carragénine.



nNOS



c-Fos



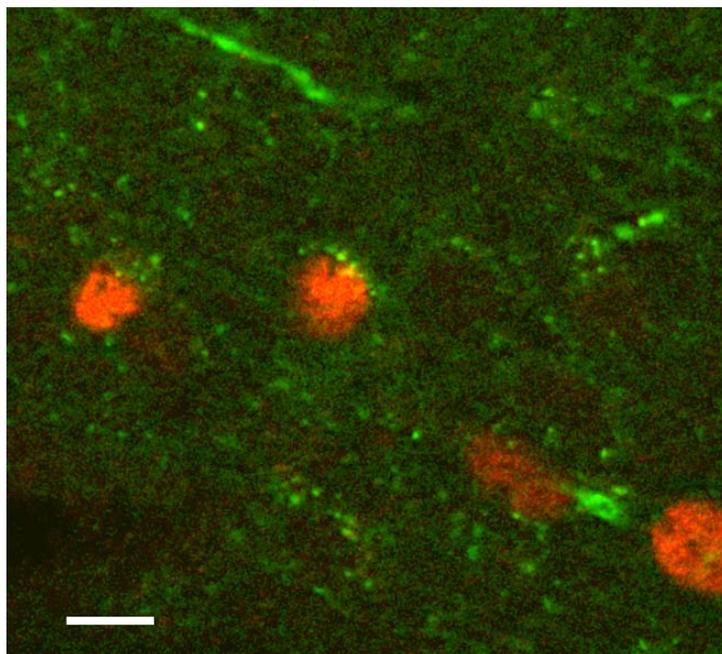
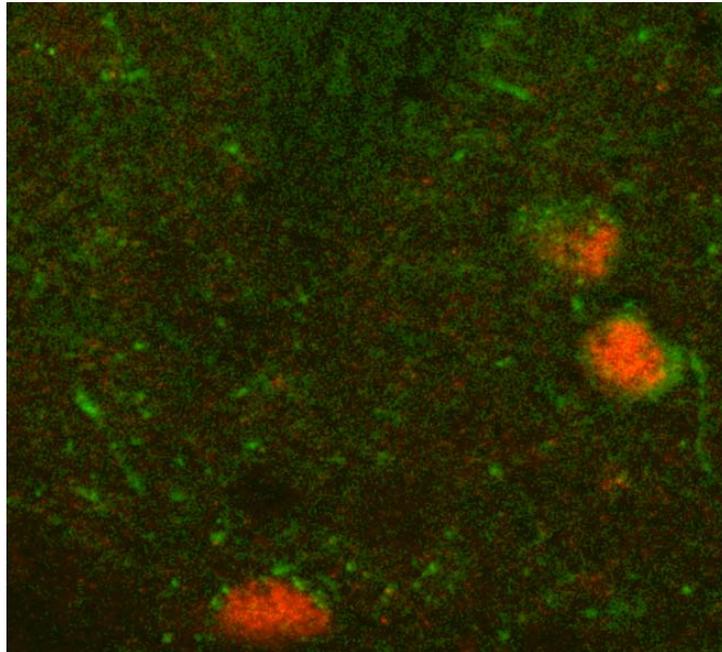
nNOS/c-Fos

**Figure 38. Double marquage nNOS / c-Fos** dans les couches superficielles de la corne dorsale de la région lombaire de la moelle épinière 3 h après injection de carragénine. Barre d'échelle : 50  $\mu$ m.

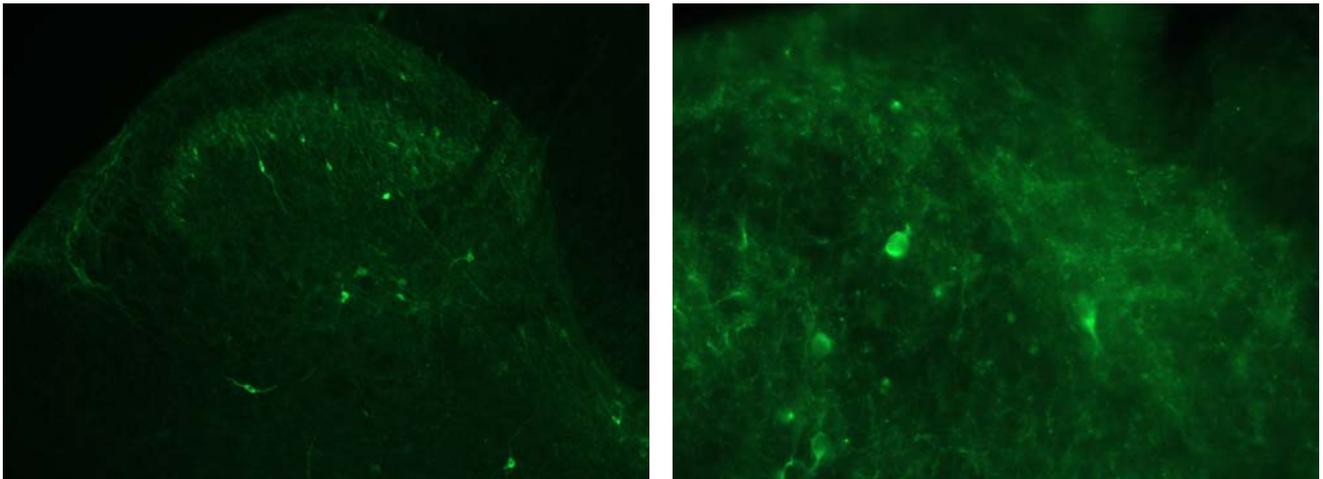
marquages c-Fos de la lamina II. De plus, une observation effectuée avec un appareil permettant d'obtenir des images comparables à celles de la microscopie confocale (Zeiss ApoTome) montre que plusieurs corps cellulaires marqués par c-Fos sont entourés de ponctuations immunoréactives à nNOS. La qualité de l'observation ne permet pas cependant de savoir si ce marquage est localisé sur la membrane du corps cellulaire ou accolé à la face externe de cette dernière. (Figure 39).

- Double marquage nNOS/FosB-LI

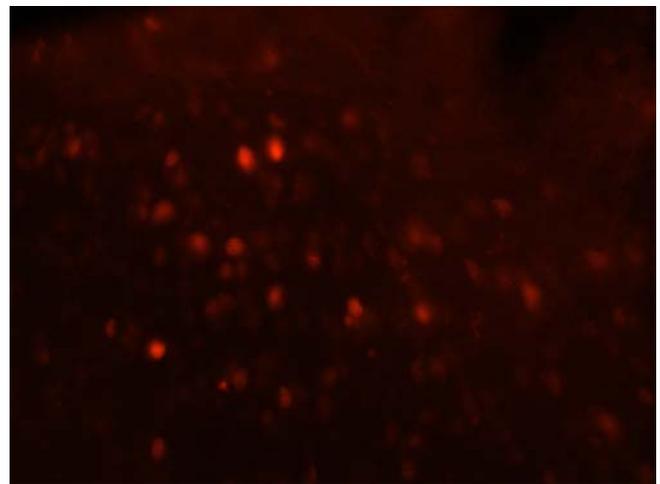
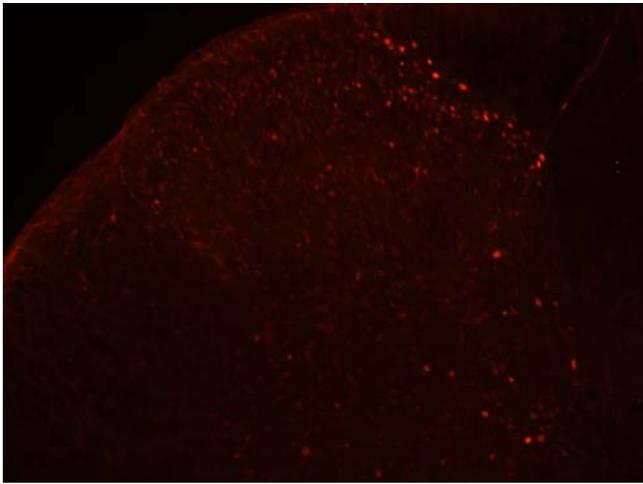
Des essais préliminaires de double marquage nNOS / FosB-LI, 3 jours après l'injection de carragénine, montrent plusieurs corps cellulaires marqués à la fois par FosB-LI et par nNOS. Les proportions de corps cellulaires doublement marqués sont du même ordre de grandeur que celles obtenues avec le couple nNOS/c-Fos. La majorité des neurones nNOS et environ ¼ des neurones FosB-LI sont doublement marqués (Figure 40).



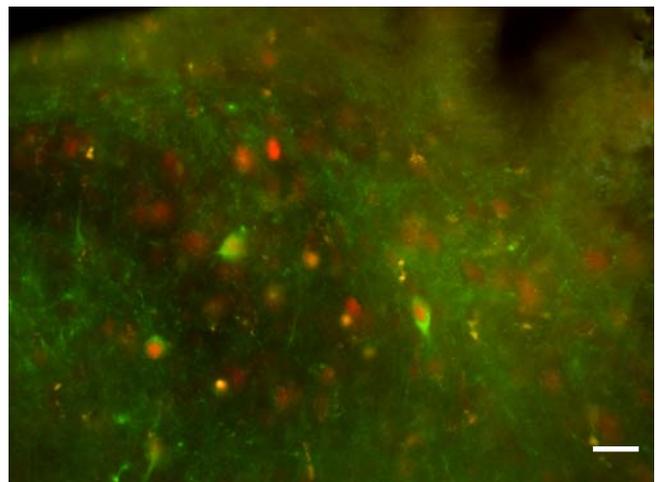
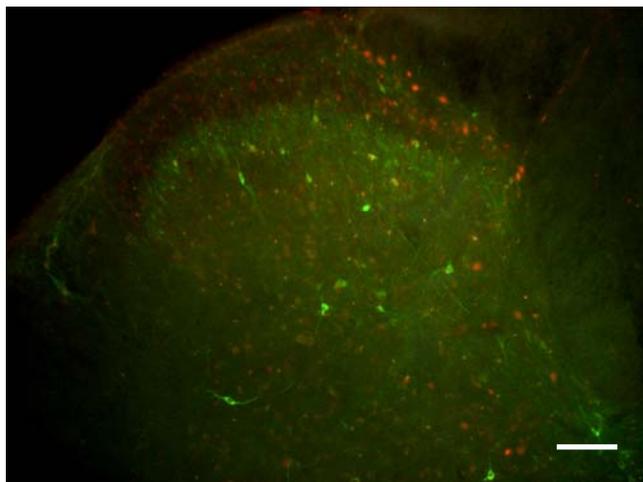
**Figure 39. Double marquage nNOS / c-Fos** dans les couches superficielles de la corne dorsale de la région lombaire de la moelle épinière 3 h après injection de carragénine. Microphotographies au microscope Zeiss ApoTome. Barre d'échelle 20µm.



nNOS



FosB/ $\Delta$ FosB



nNOS/FosB/ $\Delta$ FosB

**Figure 40. Double marquage de nNOS/FosB/ $\Delta$ FosB** dans les couches superficielles de la corne dorsale de la région lombaire de la moelle épinière 3 jours après l'injection de carragénine. Barres d'échelle : 100  $\mu$ m à gauche, 50  $\mu$ m à droite.

## IV. Discussion

*Rien n'est vrai, rien n'est faux ;  
Tout est songe et mensonge,  
Illusion du cœur qu'un vain espoir prolonge.  
Nos seules vérités, hommes,  
Sont nos douleurs  
Alphonse de Lamartine  
Extrait des Seconde harmonies poétiques et religieuses*

## **IV. DISCUSSION**

Dans notre travail de thèse, nous avons étudié les caractéristiques spécifiques de la pince Bioseb qui apparaît être un outil efficace pour mesurer la sensibilité mécanique chez les rats sains ou présentant une douleur inflammatoire de la patte.

L'observation de l'œdème, de l'activité de la MPO, et du seuil de sensibilité nociceptive mécanique et thermique obtenus par l'injection intraplantaire unilatérale de carragénine nous a permis de caractériser une phase précoce et une phase tardive. Cette dernière nous permet de proposer ce modèle carragénine comme modèle de douleur soutenue.

Notre étude immunocytologique de facteurs de transcription montre que le marquage FosB-LI augmente dans les couches I et II de la moelle épinière et subsiste pendant 7 jours après l'injection de carragénine.

Les doubles marquages de nNOS et c-Fos d'une part et de nNOS et FosB-LI d'autre part, montrent que dans les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière de rat, les deux facteurs de transcription sont souvent présents dans des cellules exprimant nNOS dont le nombre et la répartition ne varient pas de manière significative pendant toute la durée de l'expérience.

### **1. PINCE CALIBREE BIOSEB**

#### **1.1 Caractéristiques du test nociceptif mécanique**

Notre étude a démontré que la pince calibrée est facile à utiliser et permet de réaliser des mesures sensibles et fiables de la sensibilité mécanique de la patte du rat.

Plusieurs publications font état de l'utilisation d'une pince calibrée. L'utilisation la plus simple a consisté à appliquer une compression contrôlée sur le nerf sciatique du rat pour induire une lésion (Nawwar et coll., 1995). Quelques études ont utilisé la pince pour induire une stimulation mécanique lors d'un enregistrement électrophysiologique des structures du système nerveux impliquées dans la somesthésie (Neugebauer et Li, 2002; Li et Neugebauer 2004). Récemment, la pince a été employée pour mesurer la douleur de l'articulation du

genou dans un modèle d'arthrite expérimentale (Yu et coll., 2002; Hans et coll., 2005), et dans un modèle d'hyperalgésie primaire induite dans les tissus profonds par une inflammation (Cui, et coll., 1999; Skyba et coll., 2005). Les appareils décrits dans ces publications ont été développés de manière indépendante et les auteurs n'ont pas cherché à valider ces appareils au-delà de leurs propres besoins expérimentaux et encore moins de les standardiser les uns par rapport aux autres. Un instrument destiné à être commercialisé s'adresse par essence à plusieurs laboratoires. Il est donc nécessaire d'avoir une bonne connaissance de son domaine d'utilisation et des garanties sur la reproductibilité des résultats d'un appareil à l'autre. Le travail que nous avons effectué sur la pince Bioseb avait pour but de répondre à cette attente.

Ce dispositif, facile à employer, nous a permis d'effectuer des mesures rapides qui ne demandaient pas plus de 3 min par animal. Cette rapidité d'exécution peut probablement être augmentée en supprimant la triple mesure que nous avons systématiquement réalisée lors de cette session expérimentale. En effet, nos résultats montrent que les mesures sont stables dans chaque triplet. Il devrait donc être possible d'augmenter le rendement du protocole sans conséquence dramatique sur la précision, en exécutant seulement une mesure pour chaque session d'essai. Par ailleurs, une expérience s'échelonnant sur toute une journée peut être exécutée sans crainte d'une dérive importante due au facteur temps. En effet, les mesures répétées du seuil nociceptif sur des rats témoins ont montré une grande stabilité tout au long de la journée. D'autre part, ce dispositif, simple et peu fragile, n'a pas besoin de précautions particulières comme c'est le cas des filaments de von Frey sensibles à la température et à l'humidité et qui peuvent être déformés par une utilisation inappropriée (Moller et coll., 1998).

Les tests effectués sur plusieurs jours montrent une dérive progressive du seuil de sensibilité à la stimulation mécanique. Nous suggérons que cette dérive est due à la croissance du rat, donc de sa patte dont les caractéristiques de perception évoluent au cours du temps. Cette hypothèse s'appuie sur la corrélation que nous observons pendant la période de neuf jours, entre la courbe exprimant le gain pondéral et celle exprimant le seuil mécanique de la sensibilité nociceptive. Etant donné que cette dérive est faible, des mesures nociceptives peuvent être comparées sans difficultés dans des périodes aussi courtes que 3 jours. Lors de l'utilisation de la pince sur des périodes plus longues, il serait préférable d'employer des rats plus âgés dont le gain pondéral par unité de temps est plus faible. Les faibles écarts obtenus au cours d'une même journée, ou dans chaque triplet d'essai, suggèrent que la manipulation du rat pendant l'essai est relativement peu stressante. En effet, il est possible de glisser les deux branches de la pince autour de la patte du rat en se contentant de l'empêcher de se

déplacer. L'observation du comportement du rat montre qu'il reste indifférent au pincement jusqu'à ce qu'il exerce un retrait net de sa patte sans exprimer d'autres signes de douleur. La faible contrainte imposée au rat, ainsi que la possibilité d'échapper au stimulus nociceptif dès que le seuil est atteint, expliquent le caractère peu stressant de la manipulation. L'absence de différence significative entre les deux pattes, ainsi que la faible variabilité entre les différents essais effectués sur une même patte, indiquent que la pince calibrée est bien appropriée pour faire des études de comparaison entre une patte traitée et la patte controlatérale non traitée.

L'étude conçue pour évaluer la dispersion des résultats entre expérimentateurs différents, a montré que celle-ci est faible. En effet, les valeurs obtenues par les deux expérimentateurs sont très semblables alors que l'un était très exercé à cette pratique et que l'autre ne l'avait jamais pratiquée. Il est toutefois évident qu'un apprentissage destiné à se familiariser avec cette pratique expérimentale et à standardiser les manipulations est recommandé pour obtenir des résultats les plus reproductibles possibles d'un expérimentateur à l'autre. Il est évidemment impossible avec ce dispositif, de reproduire manuellement des applications mécaniques identiques à chaque essai. Cependant, la possibilité de contrôler la force appliquée en lisant la valeur indiquée sur l'affichage de l'écran de l'appareil contribue à réduire la variabilité entre les essais. En effet, cette lecture permet d'appliquer une force qui augmente aussi régulièrement que possible à une vitesse choisie à l'avance. Elle permet également d'éliminer des mesures qui, par suite de maladresse, n'auraient pas respecté les critères de régularité et de vitesse d'incrémentation fixés à l'avance. La similitude entre les valeurs de seuil de nociception obtenues par deux expérimentateurs suggère que la reproductibilité de la manipulation est suffisante. D'autre part, il est admis que le critère de fiabilité d'un test comportemental est défini par la reproductibilité des valeurs obtenues lors de stimulations répétées et non pas par la reproductibilité de l'application mécanique (Le Bars et Cadden, 2005). Nous pouvons considérer que notre dispositif répond à ce critère.

## **1.2 Comparaison avec les autres tests mécaniques classiques**

Le présent travail montre que les résultats de la pince calibrée sont conformes à ceux de l'appareil de Randall-Selitto test ou des filaments de von Frey (Hedo et coll., 1999; Budzinski et coll., 2000). Notons toutefois que le test de Randall-Selitto peut montrer une variabilité élevée en raison du stress provoqué par l'obligation de maintenir le rat dans une position qui ne lui est pas familière. Cette variabilité nécessite l'utilisation d'un grand nombre de rats ( $\geq 6$ ) habitués plusieurs fois à la manipulation pour réduire cette variabilité et atteindre

un niveau de significativité satisfaisant entre les groupes différents (Taiwo et coll., 1989; Anseloni et coll., 2003). Notre étude suggère que ces difficultés sont moins importantes avec la pince calibrée, de sorte qu'il est possible de prévoir des groupes composés de peu d'animaux et de pratiquer un entraînement rapide du rat avant le début de l'expérience.

Nous avons également réalisé des tests à l'aide des filaments de von Frey sur des rats libres de leurs mouvements, maintenus dans des boîtes de Plexiglas. En dépit de l'absence de stress de contrainte, les résultats obtenus avec des filaments de von Frey sont moins significatifs qu'avec la pince. Il faut noter que cette expérience a été réalisée à partir du même nombre d'animaux du même âge que ceux utilisés pour tester la pince. La difficulté d'obtenir des valeurs stables s'explique par le principe de mesure. En effet, le rat peut tenter de repousser le filament plutôt que de s'extraire à la pression exercée (Ren, 1999). De plus, la nécessité d'employer plusieurs filaments (au moins 3) pour trouver celui qui correspond le mieux au seuil de détection peut mener à une faible précision en raison de l'échelle exponentielle et discontinue de la taille des filaments. L'échelle exponentielle des filaments est toutefois justifiée car l'intensité du signal sensoriel est généralement proportionnelle au logarithme de l'intensité de la stimulation.

Il faut noter également que les deux tests ne produisent pas des stimulations identiques. Les valeurs obtenues par la pince calibrée ou par les filaments de von Frey diffèrent d'un facteur de  $\sim 2$ , qui résulte principalement de la forme différente des dispositifs. Les filaments de von Frey appliquent une force sur un secteur très petit de la surface plantaire, par exemple,  $0,42 \text{ mm}^2$  pour le filament de von Frey N° 5.88 (Levin, 1978; Pitcher et coll., 1999) alors que la pince calibrée produit un effet de pincement sur une surface plus grande ( $\sim 10 \text{ mm}^2$ ) appliquée sur les deux faces de la patte. Etant donné que la pression représente le stimulus réel appliqué à la patte, il est nécessaire d'imprimer une force plus grande à la pince qu'au filament de von Frey pour produire le même résultat. S'il est possible d'appliquer des stimuli d'intensité équivalente, il faut toutefois tenir compte du fait qu'il existe de grandes différences de sensibilité selon l'aire cutanée stimulée, ponctuelle dans le cas du filament de von Frey et étendue et dorso-ventrale dans le cas de la pince. Cette différence peut conduire à l'activation de différents champs récepteurs dans la moelle épinière et/ou dans les structures supra-spinales.

### **1.3 L'utilisation de la pince calibrée révèle les effets analgésiques de la morphine**

L'analgésie et la tolérance à la morphine ont été étudiées pour s'assurer qu'il est possible de reproduire des résultats connus avec la pince calibrée. Dans la présente étude, ce dispositif a permis de détecter l'analgésie induite par de faibles concentrations de morphine (2,5 mg/kg). Nos résultats sont en accord avec les études précédentes utilisant le test de la plaque chaude («hot plate») et celui du retrait de la queue («tail flick») sur des rats de souche Wistar (Zharkovsky et coll., 1999). D'autre part, l'expérience d'exposition répétée des rats à la morphine (10 mg/kg) montrent des résultats originaux nous permettant de conclure qu'il existe une tolérance progressive aux effets analgésiques de la morphine (Honoré et coll., 1997; Gilron et coll., 2003). L'hypothèse d'une tolérance aux effets analgésique de la morphine n'est pas nouvelle mais plusieurs auteurs (Mao et coll., 1994; Laulin et coll., 1998, 1999, 2002; Célèrier et coll., 2001) considèrent que celle-ci n'est qu'apparente et qu'elle est le résultat d'une diminution retardée et progressive de la valeur de base du seuil de sensibilité nociceptive d'une stimulation mécanique (Laulin et coll., 1998, 1999, 2002; Célèrier et coll., 2001) ou thermique (Mao et coll., 1994) consécutive à l'injection répétée des opiacés (Célèrier et coll., 2001; Mao, 2002). Ils fondent leur argumentation sur le fait que dans leurs modèles, l'amplitude de l'augmentation du seuil de sensibilité qui suit une injection d'opiacés n'est pas modifiée au cours du traitement. Dans notre modèle, l'injection de morphine appliquée une fois par jour pendant 5 jours n'affecte pas la valeur de base du seuil de stimulation mécanique appliquée par la pince. En revanche, nous observons une diminution de la valeur obtenue 30 min après une injection de morphine. La stabilité de notre valeur de référence nous permet donc de conclure que la diminution observée après injection de morphine révèle une tolérance réelle et non pas apparente. Les différences entre notre protocole et ceux de la littérature (contrainte du rat, voie d'injection, tests nociceptifs) n'expliquent pas la divergence des résultats. Il faut toutefois noter que notre protocole (choix du dérivé opiacé, dose, programme d'injection) permet l'obtention d'une valeur de référence stable révélant une éventuelle tolérance avec plus de précision. De plus, les phénomènes de tolérance et d'hyperalgésie sont très sensibles au type d'agoniste opiacé utilisé et/ou à la dose injectée. En effet, le phénomène d'hyperalgésie progressive est généralement montré en utilisant de l'héroïne (Laulin et coll., 1998, 1999; Célèrier et coll., 2001) ou du fentanyl (Laulin et coll., 2002) plutôt que de la morphine. Deux études indiquent toutefois que la morphine intrathécale ou intraveineuse peut également induire une hyperalgésie (Grisel et

coll., 1994; Mao et coll., 1994) mais cet effet est étroitement dépendant de la voie d'administration. En effet, une l'étude de Grisel et coll., 1994 a montré que la voie intraveineuse induit une hyperalgésie, tandis que la voie sous-cutanée est inefficace. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les opiacés doivent avoir une action puissante et rapide pour induire une hyperalgésie à long terme. Il est donc probable que ces conditions different dans notre modèle d'injection sous-cutanée de morphine à faible dose de sorte que l'hyperalgésie ne se manifeste pas. Enfin, dans les études précédentes, la tolérance aux opiacés était généralement déterminée en comparant les effets qui suivent une injection à ceux qui la précédent, avant puis après la totalité du traitement chronique. Contrairement à cette procédure, nous avons systématiquement mesuré la sensibilité mécanique nociceptive en pratiquant un test avant et après l'injection quotidienne de morphine pendant toute la durée du traitement. Cette procédure, applicable grâce à la stabilité des mesures effectuées avec la pince Bioseb, offre ainsi la possibilité de détecter non seulement les effets analgésiques aigus mais également durables d'une drogue, ainsi que les changements potentiels du seuil nociceptif basique consécutif à un traitement chronique.

En conclusion, notre étude montre que la pince calibrée Bioseb est pratique pour réaliser des études du seuil nociceptif mécanique de la patte chez les rats. En effet, cet outil facile à utiliser, permet de tester rapidement les animaux et répond aux critères qu'il est indispensable de respecter lors de la mesure du seuil nociceptif; c'est-à-dire, la sensibilité, la fiabilité et la reproductibilité (La Bars et Cadden, 2005).

## **2. MODELE CARRAGENINE, UN MODELE DE DOULEUR SOUTENUE**

Dans nos conditions expérimentales, les effets de la carragénine persistent pendant plusieurs jours. En effet, l'hyperalgésie mécanique et l'œdème sont encore présents respectivement 7 et 28 jours après l'injection de carragénine. Depuis le travail de Winter et coll. (1962) beaucoup d'études comme celles de Di Rosa (1972) ont montré que les effets de la carragénine apparaissent rapidement après l'injection et atteignent leur valeur maximale 4 à 6 h plus tard. Pour cette raison, la carragénine est habituellement employée pour étudier l'inflammation aiguë mais différentes données indiquent que l'œdème et que l'hyperalgésie persistent pendant plusieurs jours (Suzuki et coll., 1996; Kissin et coll., 1998; López-Avila et coll., 2004). Nos propres données montrant la persistance de l'hyperalgésie mécanique et l'œdème, sont en accord avec les effets à long terme de la carragénine. Cet effet à long terme peut expliquer l'absence de gain pondéral qui suit l'injection de carragénine. Cette perte pourrait être due à la réduction des mouvements du rat consécutive de l'hyperalgésie (Solano et Herrero, 1999), et à l'effet anorexique des cytokines plasmatiques pro-inflammatoires (Agnello et coll., 2002) qui augmentent à leur tour le taux de leptine circulante (Gualillo et coll., 2000).

### **2.1 L'œdème**

En accord avec les données de la littérature (Vinegar et coll., 1987), nous montrons que plus de 20 jours sont nécessaires pour observer la disparition complète de l'œdème. Les travaux de Vinegard montrent que la réponse inflammatoire persiste 2 à 3 jours, avant que ne commence une phase de reconstruction du tissu. L'hyperalgie est associée à la réponse inflammatoire qui peut être révélée par différents marqueurs tels que la MPO (Bhatia et coll., 2005), le NO ou la prostaglandine  $E_2$  (Posadas et coll., 2004). Dans un modèle d'inflammation induite par la carragénine chez la souris, le niveau des marqueurs inflammatoires retrouve leur valeur de base après 48 h alors que l'œdème conserve encore sa valeur maximale (Posadas, 2004). Ces observations sont en accord avec nos résultats montrant que l'activité de la MPO dans la patte du rat atteint une valeur maximale 24 h après l'injection de carragénine puis décroît rapidement pour devenir non mesurable à 3 jours. La durée différente du marqueur inflammatoire et de l'œdème suggère que dans notre modèle, la réponse inflammatoire n'est active que pendant la phase de croissance de l'œdème (Vinegar et coll., 1987; Hurley et

Willoughby, 1973). Donc, l'œdème ne peut pas être utilisé comme un indicateur de l'inflammation à long terme, du moins lorsqu'il est évalué par la mesure du volume de la patte. L'inflammation est un phénomène complexe qui implique de nombreux acteurs dont l'action se succède dans le temps. L'apparition de l'activité de la MPO libérée par les granulocytes correspond à une phase relativement précoce. L'affaiblissement de son activité ne signifie donc pas que tous les processus inflammatoires soient terminés. Les phases qui suivent telles que le recrutement des macrophages et lymphocytes et de leurs médiateurs associés (cytokines: IL1, TNF et protéases: C3, C5) sur le lieu de l'inflammation pourraient contribuer à entretenir l'hyperalgésie qui se prolonge au-delà de la phase d'activité de la MPO. (Lawrence et coll., 2002; Nathan, 2002; Rousset et coll., 2005).

## **2.2 Hyperalgésie mécanique et thermique**

Comme décrit par Koltzenburg (1995), nous avons observé une différence temporelle entre les patrons d'expression de l'hyperalgésie thermique et mécanique. En effet, le déroulement temporel de l'hyperalgésie thermique est plus court (24 h), que celui de l'hyperalgésie mécanique (7 jours). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les messages nociceptifs thermiques impliquent principalement l'activation des fibres afférentes primaires de type C non myélinisées, qui projettent dans la couche II de la corne dorsale (Light et Perl, 1979a; Light et coll., 1979), alors que les messages nociceptifs mécaniques impliquent l'activation des afférences primaires A $\delta$ , qui projettent principalement dans la couche I et les couches plus profondes (III-V) mais faiblement dans la couche II (Light et Perl, 1979b). En accord avec cette hypothèse, les fibres A $\beta$ , qui sont considérées comme les médiateurs principaux de l'allodynie mécanique (Woolf et Doubell, 1994; Ossipov et coll., 1999, 2000), projettent exclusivement dans les couches profondes (III-VII) mais pas dans les couches I-II (Ralston et coll., 1984; Light et Perl, 1979a). Par conséquent, il s'avère qu'un mécanisme inhibiteur, qui affecterait préférentiellement les messages des fibres C dans la couche II, aurait principalement un impact sur l'hyperalgésie thermique, tandis que l'inhibition de la transmission nociceptive mécanique exigerait une inhibition accrue dans des couches plus profondes.

Des données récentes obtenues au laboratoire (Poisbeau et coll., 2005), montrent une augmentation de la production de neurostéroïdes 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ - réduits (5 $\alpha$ NS) dans la lamina II de la moelle épinière en réponse à une inflammation douloureuse périphérique. Cette surproduction

mène à une potentialisation de la transmission synaptique inhibitrice dans la couche II et à une inhibition parallèle de l'hyperalgésie thermique, tandis que l'hyperalgésie mécanique ou l'allodynie sont inchangées. Ces résultats renforcent l'idée que les messages nociceptifs thermiques et mécaniques sont traités par des voies séparées et modulés par des mécanismes endogènes distincts (Bian et coll., 1998; Ossipov et coll., 1999).

### **3. PLASTICITE NEURONALE ET FACTEURS DE TRANSCRIPTION FOS DANS LA MOELLE**

Après traitement par la carragénine nous avons observé une augmentation progressive du nombre de marquages par  $\Delta$ FosB dans la région de la moelle épinière correspondant à l'aire de projection ipsilatérale des afférences primaires nociceptives. Cette augmentation est maximale dans le segment L4 de la moelle épinière. Dans ce segment, la surexpression de  $\Delta$ FosB dure aussi longtemps que l'hyperalgésie mécanique induite par la carragénine. Ces résultats suggèrent que  $\Delta$ FosB pourrait être impliqué dans la plasticité à long terme de la moelle épinière dépendant de l'inflammation induite par carragénine. Ils montrent également que l'utilisation d'un anticorps qui reconnaît FosB et  $\Delta$ FosB, est potentiellement un bon marqueur moléculaire des phases tardives de la douleur.

Les protéines Fos sont l'expression des gènes *c-fos*, *fosB*, *fra-1* et *fra-2* (Hughes et Dragunow., 1995; Herdegen et Leah., 1998). Tandis que leur expression est faible dans les conditions de base, elle augmente en réponse à une variété de stimulus.  $\Delta$ FosB est une variante tronquée qui résulte de l'épissage de FosB. Lors de l'activation de l'expression du gène, les modifications post-traductionnelles qui affectent  $\Delta$ FosB mènent à différentes isoformes (33, 35 and 37 kDa) dont les demies-vies s'échelonnent entre 10 h et 8 jours, selon le cas (Chen et coll., 1997; Kelz et Nestler, 2000; Nestler et coll., 2001; Mc Clung et coll., 2004). A notre connaissance, il n'existe pas d'anticorps spécifique dirigé contre  $\Delta$ FosB. Les isoformes FosB et  $\Delta$ FosB dont les poids moléculaires sont différents peuvent être révélées par la technique de Western blot mais nous n'avons pas utilisé cette technique en raison de sa sensibilité relativement faible, et de la nécessité de disposer de grands échantillons de tissu ou exprimant massivement  $\Delta$ FosB (Hope et coll., 1994a, 1994b; Kelz et coll., 1999; Chen et coll., 2000). Dans notre étude, une approche morphologique a été employée, basée sur la comparaison des marquages immunocytologiques obtenus avec deux anticorps. Bien que cette technique ne permette pas de discriminer les isoformes de  $\Delta$ FosB, elle permet de différencier clairement le marquage de FosB du marquage de  $\Delta$ FosB. Comme décrit dans la méthode, un anticorps contre la région C-terminale de FosB qui est absente dans  $\Delta$ FosB a été utilisé. La spécificité de cet anticorps qui identifie FosB mais pas  $\Delta$ FosB a été précédemment validée (Perrotti et coll., 2004, 2005). Le second anticorps utilisé, disponible dans le commerce, est

dirigé contre une région interne de FosB, de sorte qu'il identifie à la fois FosB et  $\Delta$ FosB (FosB-LI).

Précédemment, cette technique a été employée avec succès pour révéler  $\Delta$ FosB, dans des structures du cerveau de rat après un stress chronique (Perrotti et coll., 2004) et dans une sous-région limitée de l'aire tegmentale ventrale après un traitement chronique de cocaïne (Perrotti et coll., 2005).

Le facteur c-Fos est l'un des facteurs de transcription les plus utilisés dans les études de la douleur. Il est généralement étudié aux stades précoces de l'inflammation (Buritova et coll., 1996; 1997; Jergová et coll., 2002; Le Guen et coll., 2003) au cours desquels il est exprimé. Des études montrent une expression de c-Fos à long terme sur des modèles de douleur autres que l'inflammation périphérique, après une stimulation intrathécale électrique (Sandkühler et coll., 1996) ou après constriction chronique du nerf sciatique (Catheline et coll., 1999; Jergova et Cizkova, 2005). Deux de ces études (Sandkühler et coll., 1996; Jergova et Cizkova, 2005) suggèrent que l'expression de c-Fos dans les neurones de la moelle épinière n'est pas une condition suffisante pour induire des changements à long terme de la nociception dans la moelle épinière.

Nos résultats montrent un marquage spécifique de FosB 8 h après l'injection de carragénine. Ils sont en accord avec les données sur le décours temporel connu de l'induction de FosB dans des couches superficielles de la moelle épinière après injection de formaline dans la patte postérieure du rat (Herdegen et coll., 1991; 1994; Hope et coll., 1992). L'induction spécifique de FosB que nous avons observée est transitoire. Sa disparition au-delà de 24 h, indique sans ambiguïté que le marquage obtenu avec l'anticorps FosB-LI dans la période qui s'étend de 24 h jusqu'à 7 jours est uniquement dû à  $\Delta$ FosB.

Notre étude montre un marquage FosB-LI dans des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière de rats naïfs ou de rats témoins ayant reçu une injection d'un volume de milieu salin identique à celui de la solution de carragénine. En revanche, nos données, ainsi que les études sur c-Fos et FosB (Herdegen et coll., 1991, 1994; Lantéri-Minet et coll., 1993), montrent des niveaux de base extrêmement faibles dans la moelle épinière. Le marquage de FosB-LI relativement important que nous observons chez des rats naïfs et témoins pourrait s'expliquer par la stabilité de la protéine qui favorise son accumulation.

Cette expression de base est minimale dans les segments lombaires, au niveau L4 de la moelle épinière correspondant à la région des afférences primaires nociceptives de la surface glabre de la patte postérieure. Cette différence régionale entre les différents niveaux lombaires est étonnante mais une hypothèse basée sur des résultats récents peut l'expliquer. On sait en effet que le réflexe nociceptif de retrait de la patte est contrôlé par des circuits organisés de façon modulaire de telle sorte que chaque module commande principalement un muscle (Schouenborg et Weng, 1994; Pouget et Snyder, 2000). L'entrée sensorielle de la patte en contact avec le sol agit en tant que filtre et il est connu que la transmission synaptique des messages nociceptifs dans les circuits nerveux recevant de forts afflux tactiles non nociceptifs s'affaiblit par rapport aux circuits nerveux qui sont moins sollicités (Peterson et coll., 2003). Puisque la surface glabre de la patte postérieure est évidemment soumise à un influx tactile intense, il est possible qu'un contrôle puissant des de la transmission nociceptive puisse avoir comme conséquence une expression plus faible de  $\Delta$ FosB en l'absence de stimulations nociceptives. Cette faible expression de  $\Delta$ FosB dans les conditions de base permet de distinguer plus facilement l'augmentation du nombre de marquages constatée au cours de l'inflammation.

Dans le segment L4, nous observons après injection de carragénine, une augmentation significative du nombre de cellules marquées  $\Delta$ FosB, dans les couches superficielles de la corne dorsale (3,5 fois) ainsi que dans les couches profondes qui persiste pendant 7 jours.

La persistance de ce marquage suggère que les modifications de l'expression des protéines dépendant de  $\Delta$ FosB peuvent jouer un rôle dans la modulation à long terme de la transmission de la douleur dans la moelle épinière, cependant les mécanismes impliqués ne sont pas connus.

La discussion du rôle joué par  $\Delta$ FosB dans la plasticité locale dépasse le cadre de notre présente étude mais il est possible de formuler des hypothèses s'appuyant des résultats connus. Une redistribution de l'éphrineB liée à l'expression de c-Fos dans des membranes présynaptiques des neurones sensoriels nociceptifs primaires (Battaglia et coll, 2003) est observée mais il s'agit d'un effet à court terme observé dans les heures qui suivent une injection de carragénine dans la patte du rat. À notre connaissance, les effets à long terme de l'inflammation sur la plasticité neuronale n'ont été étudiés qu'en utilisant l'adjuvant de Freund (Goff et coll., 1998; Nakatsuka et coll., 1999). Dans ces conditions, une augmentation des afflux monosynaptiques de fibres A $\beta$  sur des neurones de la substantia gelatinosa est observée

7 à 10 jours après l'injection de l'adjuvant de Freund qui suggère une prolifération des terminaisons A $\beta$ .

Nos hypothèses peuvent également s'appuyer sur l'identification de gènes cibles connus de  $\Delta$ FosB dans d'autres structures du système nerveux. En effet, il a été montré que  $\Delta$ FosB agit selon le cas, comme répresseur ou comme activateur transcriptionnel, en fonction de son expression au cours du temps ou en fonction du type de gène et de cellule impliqués (Dobrazanski et coll., 1991; Nakabeppu et Nathans, 1991; Yen et coll., 1991; Chen et coll., 1997; McClung et Nestler, 2003). *In vivo*, différents gènes cibles de  $\Delta$ FosB ont été identifiés, principalement dans le complexe du striatum ou dans l'hippocampe (Kelz et coll., 1999; Chen et coll., 2000; McClung et Nestler, 2003). Certains d'entre eux pourraient également être régulés dans la moelle épinière et impliqués dans la nociception. En effet, le gène de la kinase CDK5 est une des cibles identifiées dans le cerveau (Chen et coll., 2000). et une étude récente utilisant une injection intrathécale de roscovitine pour inhiber l'activité CDK5 suggère que cette kinase est impliquée dans la douleur inflammatoire induite par la formaline (Wang et coll., 2005). Il est également montré que  $\Delta$ FosB régule l'expression de la sous-unité NR1 des récepteurs NMDA (Hiroi et coll., 1998) et de la sous-unité GluR2 des récepteurs AMPA (Kelz et coll., 1999) dans le cerveau. Les récepteurs ionotropiques du glutamate sont impliqués dans la transmission des signaux nociceptifs dans la moelle épinière (Zieglgansberger et Tolle, 1993; Millan, 1999) et les récepteurs NMDA et AMPA contribuent au développement de l'hyperalgésie et de l'allodynie (Stanfa et Dickenson, 1999; Rygh et coll., 2001; Voitenko et coll., 2004) et au maintien de la douleur persistante (Dubner et Ruda, 1992;Coderre et coll., 1993; Zhou et coll., 2001; South et coll., 2003) qui suivent l'inflammation périphérique induite par la carragénine. Dans le même ordre d'idées, l'expression de GluR2 est affectée lors de l'inflammation de la patte postérieure du rat induite par l'adjuvant de Freund (Zhou et coll., 2001). Ces données de la littérature suggèrent que les gènes cibles des récepteurs indiqués ci-dessus sont des candidats potentiels pour de futures études visant à mieux comprendre l'action de  $\Delta$ FosB dans la moelle épinière lors d'une douleur inflammatoire.

En conclusion, nos résultats montrent clairement l'expression du  $\Delta$ FosB dans la moelle épinière pendant une hyperalgésie mécanique induite par l'inflammation périphérique produite par injection de carragénine dans la voute plantaire du rat. La surexpression de  $\Delta$ FosB suggère que ce facteur de transcription joue un rôle dans la plasticité neuronale et pourrait être

un marqueur moléculaire utile de la douleur soutenue. Une recherche plus approfondie est nécessaire pour mieux comprendre les mécanismes menant à l'expression de  $\Delta$ FosB ainsi que ceux par lesquels le rôle de ce facteur pourrait participer à la plasticité.

#### **4. nNOS**

Comme indiqué dans l'introduction, les rôles du NO et de la nNOS dans la nociception font l'objet de nombreuses études. Nous avons étudié la répartition de la nNOS dans la moelle épinière de rats traités en utilisant le modèle d'inflammation par la carragénine, des études complémentaires ont été effectuées avec le zymosan.

##### **4.1. Répartition de nNOS dans la moelle épinière chez le rat**

Le marquage que nous avons obtenu avec l'anticorps anti-nNOS est conforme aux descriptions de la littérature (Valtschanoff et coll., 1992a; Dun et coll., 1992; Reuss et Reuss, 2001; Chung et coll., 2005.). Les fibres et les neurones immunoréactifs pour nNOS sont présents dans l'ensemble de la corne dorsale, mais plus densément distribués dans le faisceau postérolatéral, à l'intérieur de la lamina II correspondant aux terminaisons sensorielles et dans l'aire du noyau latéral spinal qui contient des terminaisons autonomes. On trouve beaucoup de petits neurones marqués dans la lamina II et quelques neurones de petite et moyenne taille dans les couches profondes. On observe des grands neurones marqués dans la lamina X aire qui entoure le canal central et dans la colonne intermédiolatérale (IML), régions autonomes spinales contenant des neurones préganglionnaires sympathiques (Zhang et coll., 1993; Saito et coll., 1994; Tang et coll., 1995).

L'observation des relations morphologiques avec le système vasculaire est en revanche originale. Seul Zochodne (2001) a rapporté une étude comparable mais la seule photographie qu'il montre est peu convaincante. Nos observations montrent clairement que dans l'IML, des fibres nerveuses immunoréactives à l'anti-nNOS longent les pieds astrocytaires péricapillaires sur la face externe des vaisseaux. Il est admis que les pieds astrocytaires sont accolés à la lame basale qui les sépare des cellules endothéliales. Il est donc vraisemblable que les fibres nerveuses viennent s'insérer entre le pied astrocytaire et la membrane basale de

l'endothélium. Toutefois, il sera nécessaire de valider cette conclusion en complétant le marquage des pieds astrocytaires par celui de l'endothélium. Si notre proposition est correcte, les fibres nerveuses devraient alors longer les cellules endothéliales sur leur face externe. Une telle disposition suggère que le NO libéré par la nNOS influence les fonctions vasculaires.

Nous n'avons pas trouvé d'images comparables à celle qui vient d'être décrite dans les autres régions de la moelle épinière. Nous avons toutefois constaté que le réseau de fibres immunoréactives à nNOS est particulièrement dense dans la *lamina II*. Compte tenu de la densité des fibres immunoréactives, il est vraisemblable que toute cette région, et en particulier les vaisseaux qui la traversent, «baigne» dans le NO. La nNOS ne semble pas pouvoir influencer de la même manière les autres régions de la moelle épinière où le marquage n'est pas aussi dense. Si une transmission volumique semble moins probable, elle n'exclut pas la participation de NO libéré par les fibres nerveuses présentes en plus ou moins grande quantité dans toute la substance grise.

La densité du réseau de capillaires dans la substance grise de la moelle épinière suggère un débit sanguin important. En effet, il a été montré que le débit régional de base dans le cerveau de rat est proportionnel à la densité du réseau de capillaires (Tuor et coll., 1994). Sachant que la densité du réseau dans la moelle épinière est identique à celle des couches II à IV du cortex cérébral, le débit sanguin pourrait atteindre au moins 100 ml/ 100 g/ min. Peut-on pour autant en conclure que le NO issu des fibres nerveuses influence le débit sanguin? La répartition des fibres nerveuses nitrergiques dans la lamina X va dans ce sens. En effet, nous avons observé que de nombreuses fibres entourent des vaisseaux vraisemblablement dotés d'une assise musculaire. Le NO pourrait donc y exercer son effet vasodilatateur. Ces observations sont en accord avec les expériences de Zochodne (2001) montrant que l'augmentation de débit sanguin spinal obtenue lors d'une stimulation nociceptive est abolie après traitement par le 7-NI, inhibiteur spécifique de nNOS. Il convient toutefois de noter que nos observations montrent que les vaisseaux de la substance grise sont très majoritairement des capillaires, donc dépourvus d'assise musculaire. Ces capillaires, comme ceux du cortex cérébral (Moro et coll., 1995) sont souvent tapisés par des fibres nerveuses nitrergiques. La présence de NO autour des vaisseaux pourrait avoir d'autres significations. On sait, par exemple que cet agent est un acteur de l'angiogénèse (Ziche and Morbidelli, 2000).

Si le rôle vasodilatateur de NO issu de nNOS est hautement probable, le marquage de la *lamina II* de la corne dorsale de la moelle épinière, région de projection des fibres sensorielles nociceptives, est aussi en accord avec le rôle hyperalgésiant bien démontré du NO. Il faut

toutefois noter que cette fonction hyperalgésiante du NO peut se manifester sur plusieurs sites. En premier lieu, le NO est un acteur important de l'inflammation périphérique et intervient comme un des facteurs responsables de l'hypersensibilité des récepteurs de la douleur. D'autre part, le marquage de la nNOS est observé dans toutes les structures du système nerveux central, y compris celles qui interviennent dans les circuits de la douleur. Une étude récente montre à cet égard que l'activité de la nNOS est modifiée dans le cortex cérébral au cours de la douleur (Talavera-Cuevas et coll., 2003). Il va donc de soi que la région cible des inhibiteurs de NOS ou des donneurs de NO dépend de la voie d'administration. Par ailleurs, divers stimulus tels qu'une inflammation du tissu nerveux induisent l'expression d'iNOS. Plusieurs études pharmacologiques (Wu et coll., 2001; Tao et coll., 2003; Sung et coll., 2004) suggèrent qu'une telle induction peut se produire dans la moelle épinière lors de stimulations douloureuses. Une étude pharmacologique destinée à déterminer le rôle de nNOS dans la moelle épinière au cours d'une douleur de type inflammatoire exige donc l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques tels que le 7-NI, administrés par voie intrathécale. Des études effectuées chez la souris (Maihofner et coll., 2000a,b; Tao et coll., 2004) montrent que nNOS dans la moelle épinière jouerait un rôle complexe. Cette enzyme interviendrait de manière différente dans la phase précoce et la phase tardive de l'inflammation. Elle participerait entre autres à la consolidation de l'hyperalgésie dans la phase tardive.

#### **4.2 nNOS et modèle de douleur inflammatoire**

Nous avons utilisé les deux modèles, carragénine et zymosan pour étudier la répartition de la nNOS au cours du temps dans la moelle épinière lors d'une douleur inflammatoire.

Les tests de sensibilité à la douleur pratiqués après injection de zymosan montrent qu'une hypersensibilité à la douleur mécanique persiste pendant plusieurs jours alors que les signes comportementaux (léchage, protection de la patte inflammée) ont disparu. Cette hypersensibilité pourrait être due, au moins partiellement, à une composante émotionnelle faisant suite à la douleur créée par le zymosan qui conduirait le rat à réagir plus rapidement à une pression appliquée sur la patte. Cette composante émotionnelle affecterait également la patte non traitée dont le seuil de réaction a diminué. Une extension du champ de sensibilité nociceptive pourrait également expliquer l'hypersensibilité observée sur la patte non traitée (Koltzenburg et coll., 1999; Dolan et coll., 2000).

Nos expériences de marquage montrent comme celle de Traub et coll. (1994) une stabilité du nombre de cellules immunoréactives à nNOS dans la lamina II, X et l'IML de la moelle épinière dans le modèle d'inflammation induite par la carragénine. L'utilisation du zymosan en lieu et place de la carragénine a donné des résultats identiques. Plusieurs données de la littérature (Lam et coll., 1996; Goff et coll., 1998; Maihöfner et coll., 2000b) montrent cependant une augmentation du nombre de cellules nitrergiques dans la lamina II quelques jours après l'injection de zymosan. De telles discordances peuvent s'expliquer par des différences dans les protocoles expérimentaux utilisés. Les études les plus anciennes utilisent un marquage enzymatique de la NADPH diaphorase dont la spécificité pour nNOS est faible. D'autre part, les expériences plus récentes utilisant des marquages immunoenzymatiques, sont réalisées chez la souris alors que nos expériences sont effectuées sur des rats. Il faut aussi noter que l'augmentation constatée par différents auteurs reste modérée de sorte qu'il est peu probable qu'elle ait une grande influence sur les fonctions exercées par nNOS.

#### **4.3 NO et facteurs de transcription**

Les activités biologiques de NO sont nombreuses et complexes et la littérature montre que NO a plusieurs cibles moléculaires.

Lee et coll., 1993 montrent que jusqu'à 40 % des neurones exprimant c-Fos dans les lamina I et II de la corne dorsale de la moelle épinière sont très proches ou apposés aux neurones exprimant nNOS lors d'une stimulation nociceptive de type inflammatoire. Aucune colocalisation n'est observée dans leur étude, en revanche NOS et c-Fos colocalisent après stimulation nociceptive de type viscéral (Martinez et coll., 1998; Gamboa-Esteves et coll., 2001; Pilyavskii et coll., 2001). De telles images sont obtenues avec le marquage de nNOS par la diaphorase ou en utilisant des anticorps spécifiques. L'originalité de nos observations repose sur deux aspects morphologiques qui ne sont pas décrits jusqu'à présent. Contrairement aux descriptions précédentes, nous montrons que des neurones nNOS positifs expriment c-Fos dans un modèle d'inflammation nociceptive de la patte du rat. Le recours à des procédés informatiques de déconvolution mis au point par la société Nikon, nous a permis de montrer clairement cette colocalisation. Nous avons également obtenu des images avec un autre procédé optique développé par Zeiss. Il est fondé sur un principe différent de celui de Nikon mais il permet, comme celui-ci, de supprimer le flou résultant de la profondeur

de champ. Dans ces conditions, nous observons de plus que plusieurs cellules immunopositives à c-Fos sont entourées par un marquage nNOS sous forme de ponctuations nombreuses à la périphérie du cytoplasme. La qualité des images obtenues ne permet pas de trancher entre un marquage intracytoplasmique ou un marquage présent dans des terminaisons qui entoureraient la cellule c-Fos positive.

Quoi qu'il en soit, ces images montrent qu'il peut y avoir une relation entre nNOS et c-Fos. En raison de la présence de fer dans la structure de l'enzyme, la guanylate cyclase (GCs) est considérée comme la cible principale du NO. L'activation des GCs conduit à celle de la protéine kinase dépendant de GMPc et à l'augmentation subséquente de la transcription du gène *c-fos* (Haby et coll., 1994; Pilz et coll., 1995; Idriss et coll., 1999). Le NO influence aussi l'activité des facteurs de transcription et module l'activité de plusieurs cascades de signalisation, ainsi que la stabilité et la traduction de l'ARNm et le traitement des produits de gènes (Bogdan, 2001). Ainsi NO peut promouvoir ou réprimer l'activation d'AP-1, facteur de transcription hétérodimérique résultant des produits de deux protooncogènes, c-Fos et c-Jun.

Les inhibiteurs de la NOS administrés par voie intrapéritonéale ou intrathécale diminuent l'expression de c-Fos ainsi que les signes de douleur lors d'une stimulation mécanique (Lee et coll., 1992) ou chimique (Honoré et coll., 1995; Gao et Qiao, 1998; Wu et coll., 2000).

En accord avec ces résultats, une étude (Wu et coll., 2000) montre que l'administration de donneurs de NO par microdialyse dans la moelle épinière provoque l'expression de c-Fos autour de la sonde. En revanche une étude contradictoire montre que des donneurs de NO ou des antagonistes administrés par voie intrathécale n'influencent pas l'expression de c-Fos provoquée par des stimulations cutanées obtenues par de l'huile de moutarde, de la formaline ou un effet thermique nociceptif (Nazli et coll., 2001). Une telle discordance reste inexpliquée.

Si plusieurs études ont recherché un lien entre nNOS et c-Fos, peu de travaux ont été consacrés à la recherche d'un lien éventuel entre nNOS et FosB. Seuls Herdegen et coll (1994) ont étudié l'expression de NOS et FosB dans la région lombaire de la moelle épinière lors de une injection de formaline dans la patte postérieure du rat. Les auteurs ont observé qu'un faible nombre de neurones réactifs à la NADPH diaphorase expriment aussi FosB dans les couches superficielles de la moelle épinière jusqu'à 24 h après l'injection. Les auteurs constatent également que plusieurs des neurones immunoreactifs à FosB sont dans le

voisinage immédiat des fibres nerveuses marquées par la NADPH diaphorase. Cette étude souffre toutefois de deux limites ; d'une part l'utilisation de la NADPH diaphorase déjà discutée plus haut et d'autre part, l'absence de données quant à la spécificité du marquage de FosB. L'utilisation d'un anticorps spécifique de nNOS et l'étude comparative que nous avons menée pour distinguer le marquage  $\Delta$ FosB du marquage FosB-LI nous permet de conclure à l'expression de  $\Delta$ FosB dans des neurones exprimant nNOS dans la corne dorsale de la moelle épinière. En effet cette colocalisation est observée plus de 24 h après une injection de carragénine (Figure 40) quand le marquage FosB-LI révèle uniquement  $\Delta$ FosB. Ce résultat suggère qu'il peut exister une relation fonctionnelle entre le facteur de transcription  $\Delta$ FosB et le NO d'origine neuronale dans la moelle épinière. Des études ultérieures pourront éclairer une telle relation.

## **V. Perspectives**

*Pendant que tu soignes les blessures,  
la douleur est un remède à la douleur.*

*Proverbe latin.*

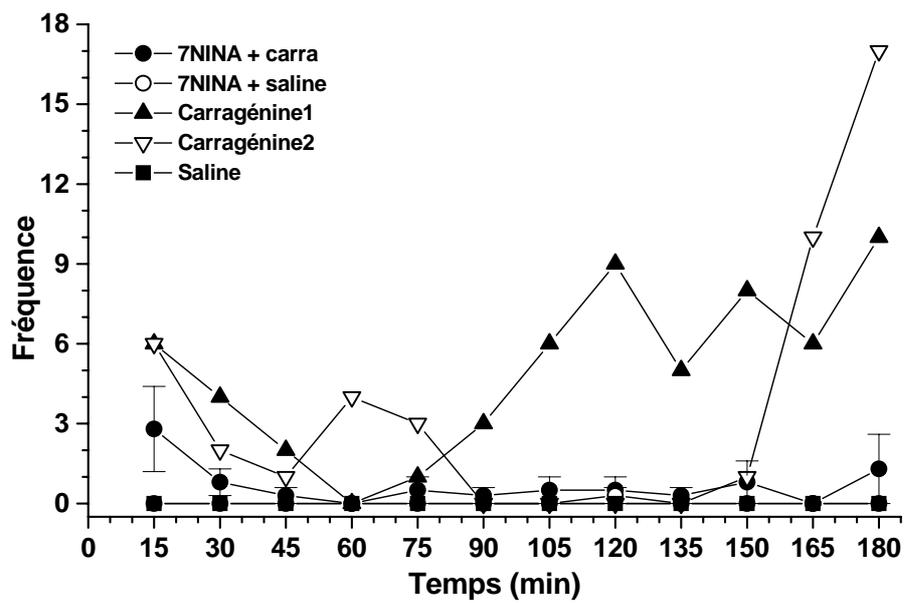
## V. PERSPECTIVES

La durée d'expression de  $\Delta$ FosB dans la moelle épinière pendant plusieurs jours après induction d'une douleur inflammatoire par la carragénine suggère la possibilité d'utiliser  $\Delta$ FosB comme un marqueur de la douleur soutenue. Des études immunocytologiques doivent être poursuivies pour étudier le rôle possible de  $\Delta$ FosB dans la plasticité de la moelle épinière. Elles devront permettre de déterminer les mécanismes de l'induction de l'expression de  $\Delta$ FosB lors d'une stimulation nociceptive de différents types (mécanique, thermique, chimique et électrique) au cours du temps en relation avec les gènes cibles de ce facteur de transcription.

Les résultats préliminaires de double marquage de nNOS/ $\Delta$ FosB qui suggèrent une relation probable entre le NO et les facteurs de transcription de type Fos sont encourageants. Les études des relations entre nNOS et  $\Delta$ FosB permettront de déterminer leurs liens cellulaires et fonctionnels dans la moelle épinière à l'échelle macroscopique et à l'échelle microscopique. Les études sensorielles et comportementales permettront d'aborder des aspects pharmacologiques étudiés par injection intrathécale d'inhibiteurs spécifiques des différentes formes de NOS, de donneurs de NO ou des inhibiteurs de gène cibles de  $\Delta$ FosB. Le rôle du NO ne pourra être complètement abordé qu'en incluant une étude de iNOS dont plusieurs études ont montré que cette enzyme est induite dans la moelle épinière lors d'une inflammation nociceptive (Meller et coll., 1994b; Guhring et coll., 2001; Sung et coll., 2004).

Nous avons effectué une étude préliminaire (Figure 41) en injectant par voie intrathécale un dérivé hydrosoluble de 7-NI (7-NINA) inhibiteur de nNOS et nous avons constaté une réduction des signes comportementaux de douleur (léchage de la patte) par rapport aux animaux injectés seulement avec la carragénine.

Les implications de NO dans le comportement ne pourront prendre toute leur signification que par une évaluation des effets des agents utilisés sur la production de NO. Quelques tentatives qu'il faudrait renouveler on montré que le NO peut être dosé *ex-vivo* par RPE sur des échantillons de moelle épinière de rats. Une mesure de l'activité enzymatique des NOS dans la moelle épinière peut également être envisagée.



**Figure 41.** Evolution au cours de 3 heures du nombre de léchages des rats ayant reçu une injection intraplantaire de carragénine ou une injection de solution saline, 30 minutes après injection intrathécale de 10 $\mu$ l (200 $\mu$ g/mL) de 7-NINA (inhibiteur de nNOS).

## **VI. Annexes**

*La douleur est un grand maître...  
Elle nous apprend qu'on est vivant  
Dominique Lévy-Chédeville  
L'homme aux passions tristes*

## **VI. ANNEXES**

### **1. SOLUTIONS**

#### **Tampon Phosphate (Pb) 0,2 M, solution stock**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12 H <sub>2</sub> O	58 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 H <sub>2</sub> O	5,28 g
Eau distillée	1 l

Vérifier le pH 7,4; utiliser dilué de moitié (0,1M)

#### **Tampon Phosphate Saline (PBS) 10X, solution stock**

NaCl	90 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12 H <sub>2</sub> O	47 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 H <sub>2</sub> O	3,46 g
Merthiolate ou thimérosal	2 g
Eau distillée	1 l

#### **Tampon Phosphate Salin Triton (PBST)**

Triton X-100	0,5 ml
PBS 1X	100 ml

#### **Tampon Tris 0,05 M; pH 7,4**

Tris	6,05 g
Eau distillée	1 l

Ajuster le pH avec HCl concentré

#### **Paraformaldéhyde 8%, solution stock**

Paraformaldéhyde en poudre	80 g
Eau distillée	1 l

La suspension est chauffée à 70°C, éclaircie par quelques gouttes de NaOH 0,1N et filtrée après refroidissement.

**Crésyl violet 0,5%**

Acide acétique 1 M	85 ml
Acétate de sodium 1 M	15 ml
Crésyl violet	1,25 ml
Eau distillée	150 ml

## 2. TABLEAUX

**Comptage au cours du temps de nombre de cellules immunoréactives pour FosB-LI dans la corne dorsale de la moelle épinière de rat après injection intraplantaire de carragénine ou solution saline dans la patte droite (Tableaux 5-15).**

Niveau lombaire	Tableau 5 : Rats naïfs			
	Laminae I-II		Laminae III-V	
	Côté gauche	Côté droit	Côté gauche	Côté droit
L1	17.85 ± 2.99	18.95 ± 2.44	15.65 ± 2.91	15.50 ± 2.45
L2	17.60 ± 1.46	18.50 ± 2.06	19.58 ± 4.26	19.85 ± 4.19
L3	16.24 ± 2.65	16.39 ± 2.45	15.77 ± 3.29	17.27 ± 3.93
L4	07.87 ± 1.08	07.97 ± 1.07	14.71 ± 2.79	15.30 ± 2.95
L5	17.73 ± 3.41	17.28 ± 2.76	17.51 ± 2.87	19.14 ± 2.10

Niveau lombaire/ groupe	Tableau 6 : 24 Heures			
	Laminae I-II		Laminae III-V	
	Côté gauche	Côté droit	Côté gauche	Côté droit
L1 Saline	19.40 ± 2.85	20.97 ± 1.82	29.97 ± 5.92	31.42 ± 5.12
L1 Carragénine	13.49 ± 1.27	18.27 ± 1.59	21.60 ± 3.58	27.66 ± 3.82
L2 Saline	19.80 ± 0.75	19.03 ± 1.63	23.26 ± 1.39	28.70 ± 4.49
L2 Carragénine	15.40 ± 0.84	19.70 ± 1.27	24.32 ± 3.40	30.61 ± 3.12
L3 Saline	15.09 ± 1.31	18.13 ± 1.15	31.10 ± 3.53	33.32 ± 3.77
L3 Carragénine	12.34 ± 1.29	19.91 ± 1.68	19.93 ± 3.45	27.95 ± 3.11
L4 Saline	09.73 ± 0.44	12.14 ± 1.04	29.13 ± 2.51	30.33 ± 2.59
L4 Carragénine	09.71 ± 0.96	23.49 ± 1.75	22.04 ± 3.62	33.70 ± 3.16
L5 Saline	11.74 ± 1.70	16.49 ± 0.64	29.16 ± 2.23	31.16 ± 2.54
L5 Carragénine	12.11 ± 1.99	19.56 ± 2.47	18.21 ± 4.64	27.80 ± 4.93

Niveau lombaire/ groupe	Tableau 7 : 3 Jours			
	Laminae I-II		Laminae III-V	
	Côté gauche	Côté droit	Côté gauche	Côté droit
L1 Saline	17.07 ± 1.18	18.99 ± 1.27	22.18 ± 2.79	24.92 ± 1.5
L1 Carragénine	21.02 ± 1.74	25.95 ± 2.19	20.17 ± 1.66	25.97 ± 2.62
L2 Saline	21.80 ± 1.92	23.60 ± 1.45	25.85 ± 0.96	26.40 ± 1.42
L2 Carragénine	23.55 ± 2.37	27.15 ± 2.72	23.50 ± 2.01	28.25 ± 2.58
L3 Saline	19.06 ± 3.70	19.05 ± 3.86	23.80 ± 2.24	27.33 ± 1.00
L3 Carragénine	19.00 ± 1.73	26.25 ± 2.25	25.58 ± 2.87	34.29 ± 2.39
L4 Saline	14.59 ± 2.13	15.62 ± 1.85	27.16 ± 2.52	29.03 ± 3.20
L4 Carragénine	14.22 ± 0.81	28.39 ± 2.67	26.39 ± 2.22	37.74 ± 3.08
L5 Saline	17.25 ± 4.62	19.41 ± 3.48	26.50 ± 4.25	29.83 ± 4.67
L5 Carragénine	19.30 ± 2.23	26.43 ± 2.59	24.53 ± 1.71	31.56 ± 2.46

Niveau lombaire/ groupe	Tableau 8 : 7 Jours			
	Laminae I-II		Laminae III-V	
	Côté gauche	Côté droit	Côté gauche	Côté droit
L1 Saline	22.73 ± 1.09	24.36 ± 2.45	20.99 ± 2.27	24.16 ± 2.37
L1 Carragénine	22.46 ± 1.21	28.62 ± 1.17	23.64 ± 1.39	26.63 ± 1.60
L2 Saline	25.93 ± 1.74	27.13 ± 2.13	24.62 ± 2.68	24.17 ± 2.13
L2 Carragénine	25.91 ± 0.51	31.70 ± 0.74	25.02 ± 2.06	36.16 ± 1.80
L3 Saline	20.75 ± 3.91	21.30 ± 3.40	26.62 ± 2.78	28.43 ± 2.75
L3 Carragénine	24.08 ± 1.55	28.86 ± 1.71	28.21 ± 2.75	34.54 ± 1.93
L4 Saline	14.73 ± 1.64	16.04 ± 0.91	29.18 ± 2.60	32.73 ± 2.39
L4 Carragénine	18.48 ± 2.22	28.52 ± 3.11	37.16 ± 4.51	44.25 ± 4.42
L5 Saline	20.33 ± 1.45	22.50 ± 3.77	30.66 ± 4.70	36.83 ± 4.18
L5 Carragénine	21.83 ± 3.49	31.66 ± 4.91	43.66 ± 4.91	49.00 ± 4.16

Niveau lombaire/ groupe	Tableau 9 : 14 Jours			
	Laminae I-II		Laminae III-V	
	Côté gauche	Côté droit	Côté gauche	Côté droit
L1 Saline	24.27 ± 2.74	24.33 ± 1.20	28.83 ± 1.87	31.72 ± 2.78
L1 Carragénine	20.16 ± 1.54	22.16 ± 1.11	25.03 ± 0.95	30.29 ± 0.95
L2 Saline	22.05 ± 3.20	23.72 ± 2.20	29.41 ± 1.69	31.48 ± 2.23
L2 Carragénine	21.92 ± 2.99	26.28 ± 3.80	27.61 ± 2.03	33.17 ± 2.04
L3 Saline	18.99 ± 1.71	19.47 ± 1.49	30.93 ± 0.91	32.77 ± 0.84
L3 Carragénine	22.45 ± 1.12	26.34 ± 1.46	29.73 ± 2.16	34.10 ± 2.99
L4 Saline	16.93 ± 1.58	16.88 ± 2.38	32.47 ± 1.46	34.76 ± 1.45
L4 Carragénine	15.72 ± 1.28	20.51 ± 2.28	30.79 ± 2.71	35.39 ± 2.75
L5 Saline	18.16 ± 2.24	19.66 ± 2.33	30.50 ± 2.29	33.33 ± 0.72
L5 Carragénine	22.50 ± 1.60	26.16 ± 0.92	31.00 ± 2.00	38.16 ± 1.16

Niveau lombaire/ groupe	Tableau 10 : 28 Jours			
	Laminae I-II		Laminae III-V	
	Côté gauche	Côté droit	Côté gauche	Côté droit
L1 Saline	19.44 ± 2.04	19.11 ± 1.82	27.22 ± 1.92	29.77 ± 2.24
L1 Carragénine	15.26 ± 1.67	18.08 ± 1.95	24.51 ± 2.63	30.01 ± 4.13
L2 Saline	21.30 ± 0.15	20.40 ± 3.21	27.16 ± 0.92	31.13 ± 1.27
L2 Carragénine	19.37 ± 3.48	23.25 ± 2.05	25.75 ± 2.78	31.75 ± 4.04
L3 Saline	18.66 ± 1.88	18.63 ± 2.41	30.42 ± 1.25	33.65 ± 1.68
L3 Carragénine	14.87 ± 2.28	17.02 ± 2.18	32.01 ± 1.56	36.14 ± 2.04
L4 Saline	16.39 ± 1.42	16.40 ± 1.42	32.41 ± 1.25	35.35 ± 1.59
L4 Carragénine	11.87 ± 1.47	14.97 ± 1.74	29.60 ± 2.31	34.21 ± 2.31
L5 Saline	±	±	±	±
L5 Carragénine	14.83 ± 2.17	18.16 ± 3.50	35.16 ± 4.83	39.16 ± 4.83

**Comptage de nombre de cellules immunoréactives pour FosB-LI dans les couches superficielles (Laminae I-II) et couches profondes (Laminae III-V) de la corne dorsale de la moelle épinière du rat aux niveaux spinaux lombaire 1-5 (L1-L5) après injection intraplantaire de carragénine ou solution saline dans la patte droite (Tableaux 11a-15b).**

	<b>Tableau 11a : Segment spinal L1</b>			
	<b>Laminae I - II</b>			
	<b>Groupe solution saline</b>		<b>Groupe carragénine</b>	
<b>Temps</b>	<b>Côté gauche</b>	<b>Côté droit</b>	<b>Côté gauche</b>	<b>Côté droit</b>
<b>0 heures</b>	17.85 ± 2.99	18.95 ± 2.44		
<b>1 jour</b>	19.40 ± 2.85	20.97 ± 1.82	13.49 ± 1.27	18.27 ± 1.59
<b>3 jours</b>	17.07 ± 1.18	18.99 ± 1.27	21.02 ± 1.74	25.95 ± 2.19
<b>7 jours</b>	22.73 ± 1.09	24.36 ± 2.45	22.46 ± 1.21	28.62 ± 1.17
<b>14 jours</b>	24.27 ± 2.74	24.33 ± 1.20	20.16 ± 1.54	22.16 ± 1.11
<b>28 jours</b>	19.44 ± 2.04	19.11 ± 1.82	15.26 ± 1.67	18.08 ± 1.95

	<b>Tableau 11b : Segment spinal L1</b>			
	<b>Laminae III -V</b>			
	<b>Groupe solution saline</b>		<b>Groupe carragénine</b>	
<b>Temps</b>	<b>Côté gauche</b>	<b>Côté droit</b>	<b>Côté gauche</b>	<b>Côté droit</b>
<b>0 heures</b>	15.65 ± 2.91	15.50 ± 2.45		
<b>1 jour</b>	29.97 ± 5.92	31.42 ± 5.12	21.60 ± 3.58	27.66 ± 3.82
<b>3 jours</b>	22.18 ± 2.79	24.92 ± 1.50	20.17 ± 1.66	25.97 ± 2.62
<b>7 jours</b>	20.99 ± 2.27	24.16 ± 2.37	23.64 ± 1.39	28.63 ± 1.60
<b>14 jours</b>	28.83 ± 1.87	31.72 ± 2.78	25.03 ± 0.95	30.29 ± 0.95
<b>28 jours</b>	27.22 ± 1.92	29.77 ± 2.24	24.51 ± 2.63	30.01 ± 4.13

	<b>Tableau 12a : Segment spinal L2</b>			
	<b>Laminae I- II</b>			
	<b>Groupe solution saline</b>		<b>Groupe carragénine</b>	
<b>Temps</b>	<b>Côté gauche</b>	<b>Côté droit</b>	<b>Côté gauche</b>	<b>Côté droit</b>
<b>0 heures</b>	17.60 ± 1.46	18.50 ± 2.06		
<b>1 jour</b>	19.80 ± 0.75	19.03 ± 1.63	15.40 ± 0.84	19.70 ± 1.27
<b>3 jours</b>	21.80 ± 1.92	23.60 ± 1.45	23.55 ± 2.37	27.15 ± 2.72
<b>7 jours</b>	25.93 ± 1.74	27.13 ± 2.13	25.91 ± 0.51	31.70 ± 0.74
<b>14 jours</b>	22.05 ± 3.20	23.72 ± 2.20	21.92 ± 2.99	26.28 ± 3.80
<b>28 jours</b>	21.30 ± 0.15	20.40 ± 3.21	19.37 ± 3.48	23.25 ± 2.05

	<b>Tableau 12b : Segment spinal L2</b>			
	<b>Laminae III -V</b>			
	<b>Groupe solution saline</b>		<b>Groupe carragénine</b>	
<b>Temps</b>	<b>Côté gauche</b>	<b>Côté droit</b>	<b>Côté gauche</b>	<b>Côté droit</b>
<b>0 heures</b>	19.58 ± 4.26	19.85 ± 4.19		
<b>1 jour</b>	23.26 ± 1.39	28.70 ± 4.49	24.32 ± 3.40	30.61 ± 3.12
<b>3 jours</b>	25.85 ± 0.96	26.40 ± 1.42	23.50 ± 2.01	28.25 ± 2.58
<b>7 jours</b>	24.62 ± 2.68	24.17 ± 2.13	25.02 ± 2.06	30.16 ± 1.80
<b>14 jours</b>	29.41 ± 1.69	31.48 ± 2.23	27.61 ± 2.03	33.17 ± 2.04
<b>28 jours</b>	27.16 ± 0.92	31.13 ± 1.27	25.75 ± 2.78	31.75 ± 4.04

	<b>Tableau 13a : Segment spinal L3</b>			
	<b>Laminae I - II</b>			
	<b>Groupe solution saline</b>		<b>Groupe carragénine</b>	
<b>Temps</b>	<b>Côté gauche</b>	<b>Côté droit</b>	<b>Côté gauche</b>	<b>Côté droit</b>
<b>0 heures</b>	16.24 ± 2.65	16.39 ± 2.45		
<b>1 jour</b>	15.09 ± 1.31	18.13 ± 1.15	12.34 ± 1.29	19.91 ± 1.68
<b>3 jours</b>	19.06 ± 3.70	19.05 ± 3.86	19.00 ± 1.73	26.25 ± 2.25
<b>7 jours</b>	20.75 ± 3.91	21.30 ± 3.40	24.08 ± 1.55	28.86 ± 1.71
<b>14 jours</b>	18.99 ± 1.71	19.47 ± 1.49	22.45 ± 1.12	26.34 ± 1.46
<b>28 jours</b>	18.66 ± 1.88	18.63 ± 2.41	14.87 ± 2.28	17.02 ± 2.18

	<b>Tableau 13b : Segment spinal L3</b>			
	<b>Laminae III -V</b>			
	<b>Groupe solution saline</b>		<b>Groupe carragénine</b>	
<b>Temps</b>	<b>Côté gauche</b>	<b>Côté droit</b>	<b>Côté gauche</b>	<b>Côté droit</b>
<b>0 heures</b>	15.77 ± 3.29	17.27 ± 3.93		
<b>1 jour</b>	31.10 ± 3.53	33.32 ± 3.77	19.93 ± 3.45	27.95 ± 3.11
<b>3 jours</b>	23.80 ± 2.24	27.33 ± 1.00	25.58 ± 2.87	34.29 ± 2.39
<b>7 jours</b>	26.62 ± 2.78	28.43 ± 2.75	28.21 ± 2.75	34.54 ± 1.93
<b>14 jours</b>	30.93 ± 0.91	32.77 ± 0.84	29.73 ± 2.16	34.10 ± 2.99
<b>28 jours</b>	30.42 ± 1.25	33.65 ± 1.68	32.01 ± 1.56	36.14 ± 2.04

	<b>Tableau 14a : Segment spinal L4</b>			
	<b>Laminae I - II</b>			
	<b>Groupe solution saline</b>		<b>Groupe carragénine</b>	
<b>Temps</b>	<b>Côté gauche</b>	<b>Côté droit</b>	<b>Côté gauche</b>	<b>Côté droit</b>
<b>0 heures</b>	07.87 ± 1.08	07.97 ± 1.07		
<b>1 jour</b>	09.73 ± 0.44	12.14 ± 1.04	09.71 ± 0.96	23.49 ± 1.75
<b>3 jours</b>	14.59 ± 2.13	15.62 ± 1.85	14.22 ± 0.81	28.39 ± 2.67
<b>7 jours</b>	14.73 ± 1.64	16.04 ± 0.91	18.48 ± 2.22	28.52 ± 3.11
<b>14 jours</b>	16.93 ± 1.58	16.88 ± 2.38	15.72 ± 1.28	20.51 ± 2.28
<b>28 jours</b>	16.39 ± 1.42	16.40 ± 1.42	11.87 ± 1.47	14.97 ± 1.74

	<b>Tableau 14b : Segment spinal L4</b>			
	<b>Laminae III -V</b>			
	<b>Groupe solution saline</b>		<b>Groupe carragénine</b>	
<b>Temps</b>	<b>Côté gauche</b>	<b>Côté droit</b>	<b>Côté gauche</b>	<b>Côté droit</b>
<b>0 heures</b>	14.71 ± 2.79	15.30 ± 2.95		
<b>1 jour</b>	29.13 ± 2.51	30.33 ± 2.59	22.04 ± 3.62	33.70 ± 3.16
<b>3 jours</b>	27.16 ± 2.52	29.03 ± 3.20	26.39 ± 2.22	37.74 ± 3.08
<b>7 jours</b>	29.18 ± 2.60	32.73 ± 2.39	37.16 ± 4.51	44.25 ± 4.42
<b>14 jours</b>	32.47 ± 1.46	34.76 ± 1.45	30.79 ± 2.71	35.39 ± 2.75
<b>28 jours</b>	32.41 ± 1.25	35.35 ± 1.59	29.60 ± 2.31	34.21 ± 2.31

	<b>Tableau 15a : Segment spinal L5</b>			
	<b>Laminae I - II</b>			
	<b>Groupe solution saline</b>		<b>Groupe carragénine</b>	
<b>Temps</b>	<b>Côté gauche</b>	<b>Côté droit</b>	<b>Côté gauche</b>	<b>Côté droit</b>
<b>0 heures</b>	17.73 ± 3.41	17.28 ± 2.76		
<b>1 jour</b>	11.74 ± 1.70	16.49 ± 0.64	12.11 ± 1.99	19.56 ± 2.47
<b>3 jours</b>	17.25 ± 4.62	19.41 ± 3.48	19.30 ± 2.23	26.43 ± 2.59
<b>7 jours</b>	20.33 ± 1.45	22.50 ± 3.77	21.83 ± 3.49	31.66 ± 4.91
<b>14 jours</b>	18.16 ± 2.24	19.66 ± 2.33	22.50 ± 1.60	26.16 ± 0.92
<b>28 jours</b>			14.83 ± 2.17	18.16 ± 3.50

	<b>Tableau 15b : Segment spinal L5</b>			
	<b>Laminae III -V</b>			
	<b>Groupe solution saline</b>		<b>Groupe carragénine</b>	
<b>Temps</b>	<b>Côté gauche</b>	<b>Côté droit</b>	<b>Côté gauche</b>	<b>Côté droit</b>
<b>0 heures</b>	17.51 ± 2.87	19.14 ± 2.10		
<b>1 jour</b>	29.16 ± 2.23	31.16 ± 2.54	18.21 ± 4.64	27.80 ± 4.93
<b>3 jours</b>	26.50 ± 4.25	29.83 ± 4.67	24.53 ± 1.71	31.56 ± 2.46
<b>7 jours</b>	30.66 ± 4.70	36.83 ± 4.18	43.66 ± 4.91	49.00 ± 4.16
<b>14 jours</b>	30.50 ± 2.29	33.33 ± 0.72	31.00 ± 2.00	38.16 ± 1.16
<b>28 jours</b>			35.16 ± 4.83	39.16 ± 4.83

### 3. GRAPHIQUES DU NOMBRE DE CELLULES FOSB-LI (Figures 42-52)

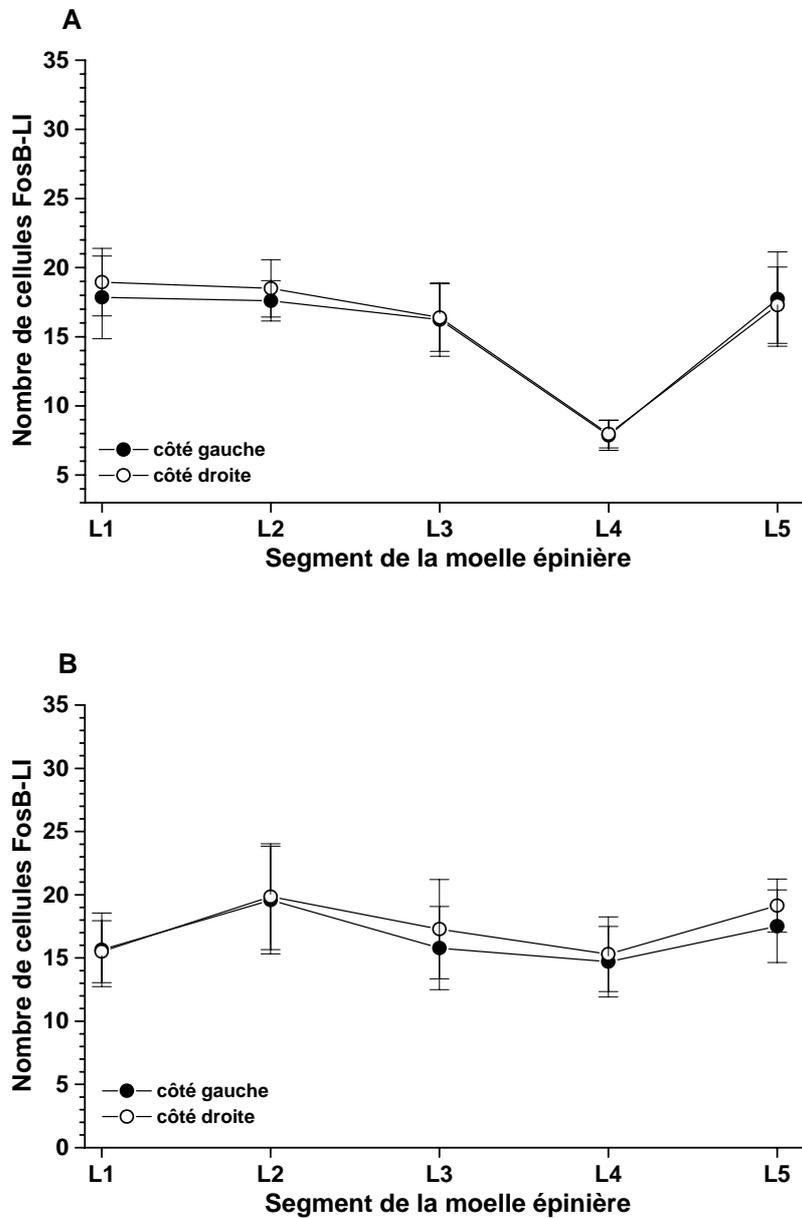


Figure 42. Graphiques de nombre de cellules FosB-LI chez les rats naïfs dans les cornes dorsales des différents segments lombaires de la moelle épinière. A) Couches superficielles. B) Couches profondes. Moyenne  $\pm$  erreur type (n = 4 ou 5 selon les niveaux).

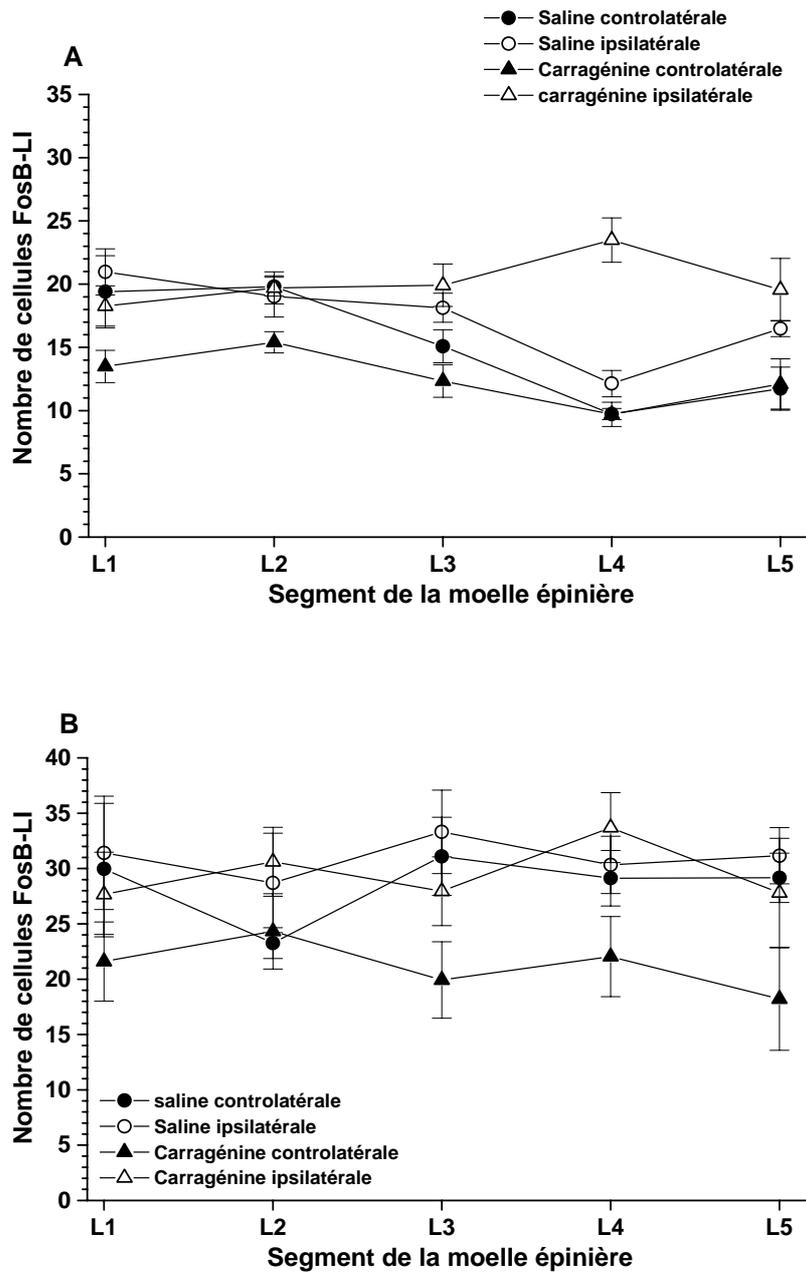


Figure 43. Graphiques de nombre de cellules FosB-LI 1 jour après injection intraplantaire de carragénine ou solution saline dans les cornes dorsales des différents segments lombaires de la moelle épinière. A) Couches superficielles. B) Couches profondes. Moyenne  $\pm$  erreur type.

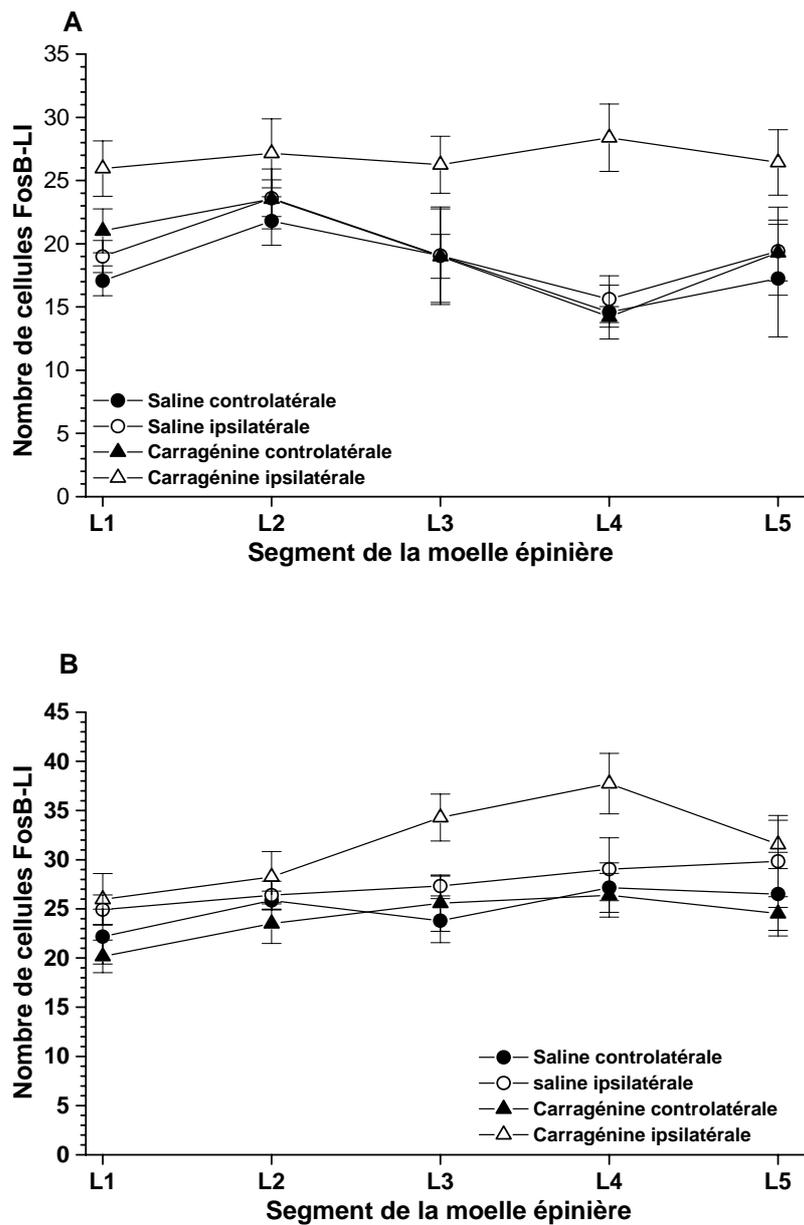


Figure 44. Graphiques de nombre de cellules FosB-LI 3 jour après injection intraplantaire de carragénine ou solution saline dans les cornes dorsales des différents segments lombaires de la moelle épinière. A) Couches superficielles. B) Couches profondes. Moyenne  $\pm$  erreur type.

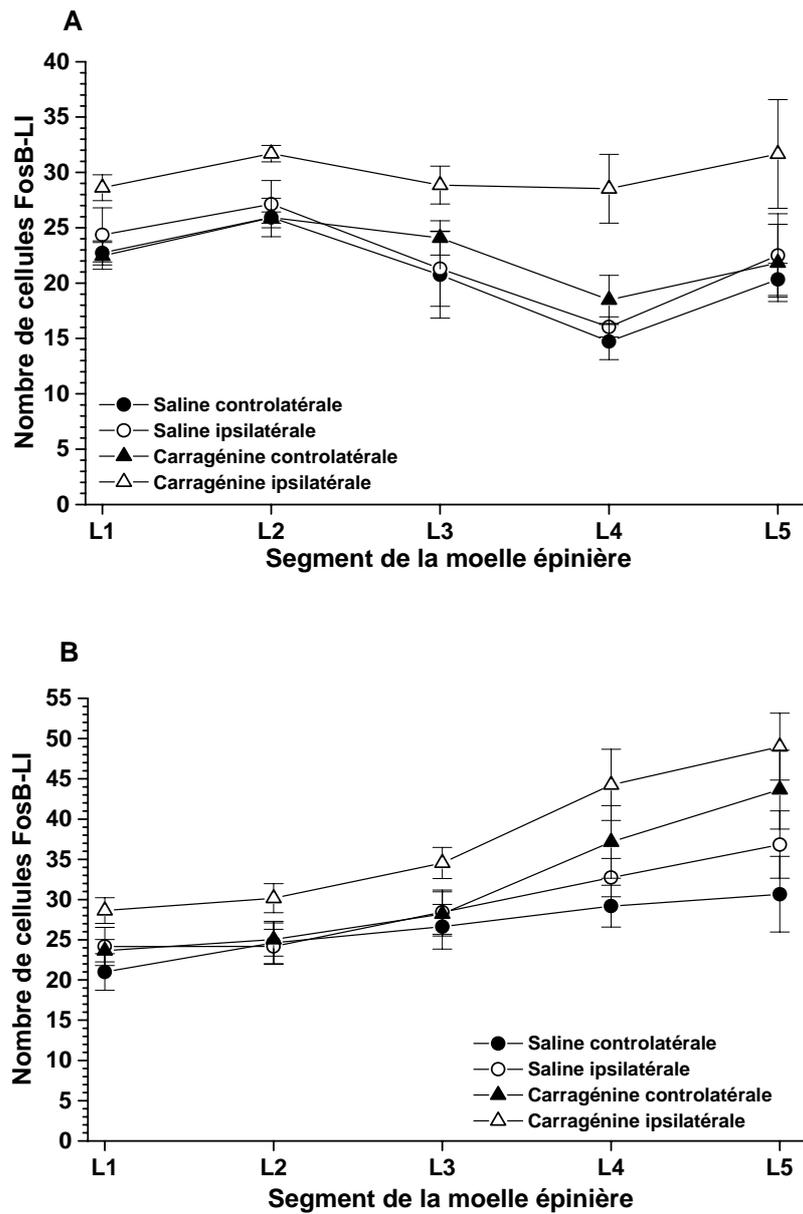


Figure 45. Graphiques de nombre de cellules FosB-LI 7 jours après injection intraplantaire de carragénine ou solution saline dans les cornes dorsales des différents segments lombaires de la moelle épinière. A) Couches superficielles. B) Couches profondes. Moyenne  $\pm$  erreur type.

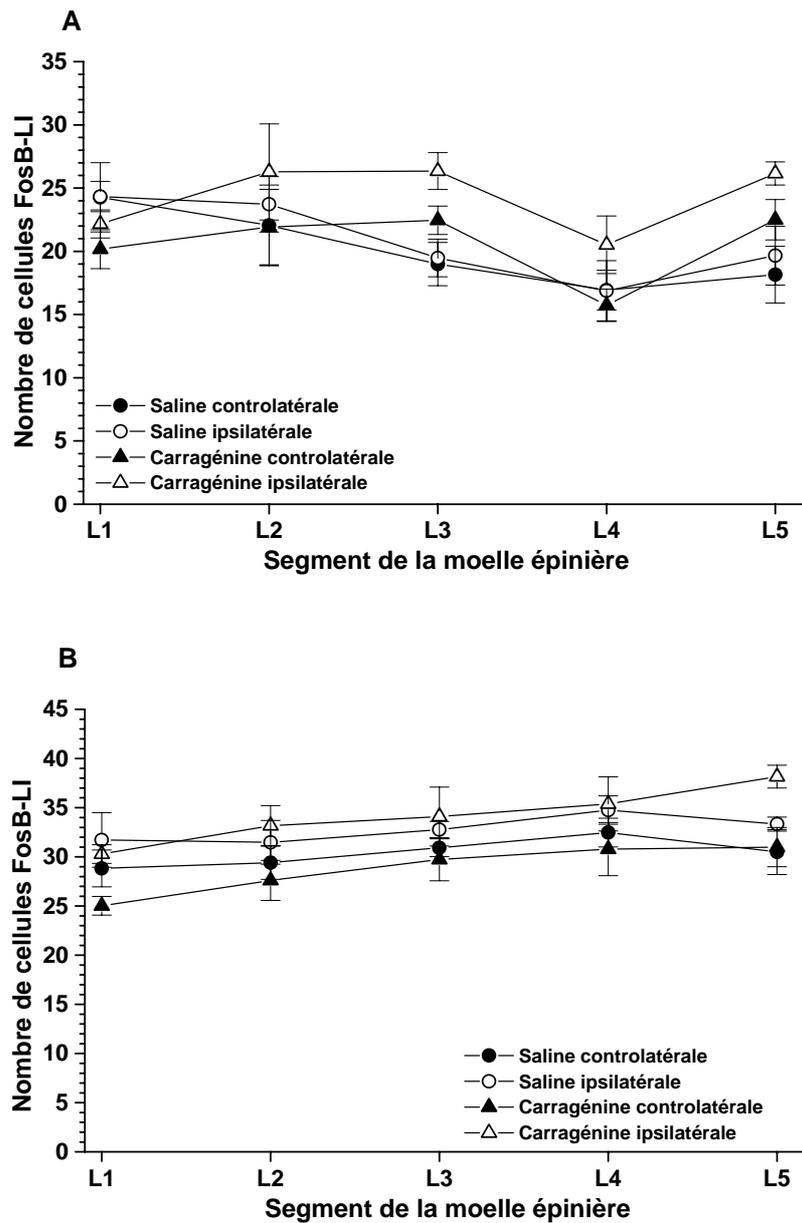


Figure 46. Graphiques de nombre de cellules FosB-LI 14 jours après injection intraplantaire de carragénine ou solution saline dans les cornes dorsales des différents segments lombaires de la moelle épinière. **A)** Couches superficielles. **B)** Couches profondes. Moyenne  $\pm$  erreur type.

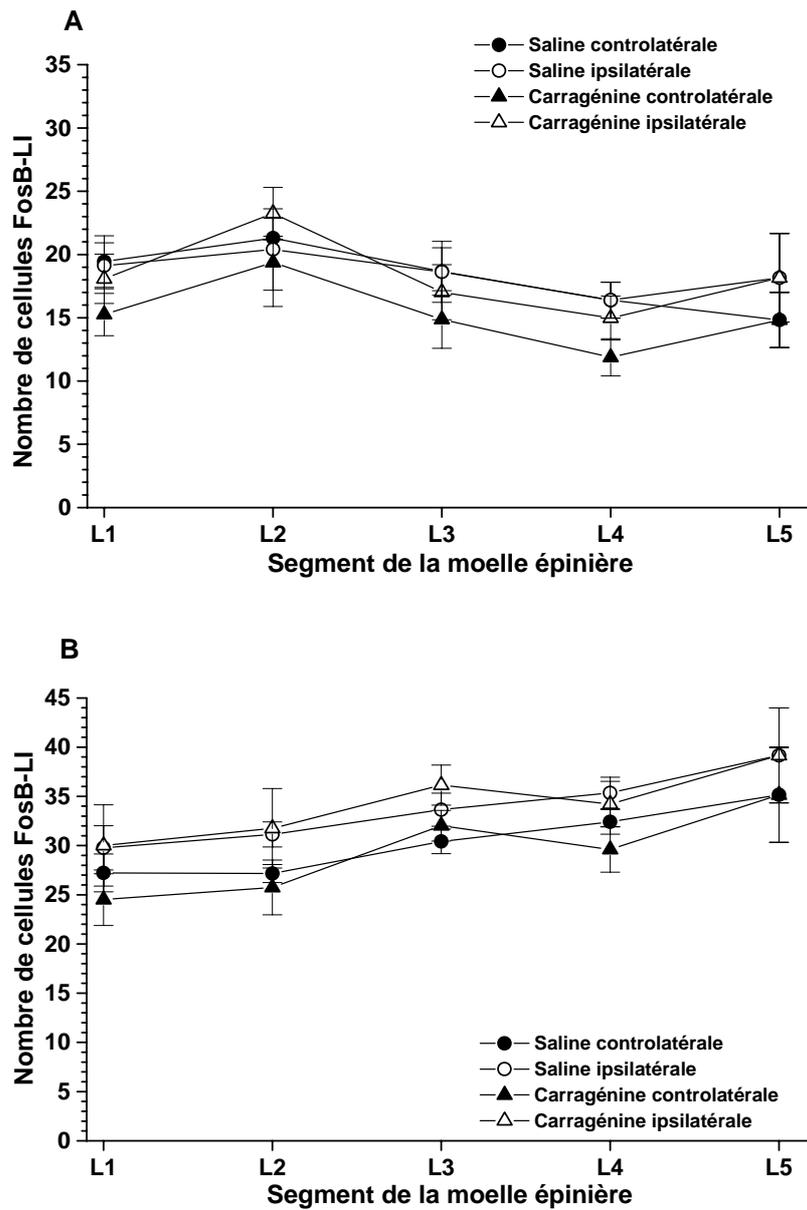


Figure 47. Graphiques de nombre de cellules FosB-LI 28 jours après injection intraplantaire de carragénine ou solution saline dans les cornes dorsales des différents segments lombaires de la moelle épinière. **A)** Couches superficielles. **B)** Couches profondes. Moyenne  $\pm$  erreur type.

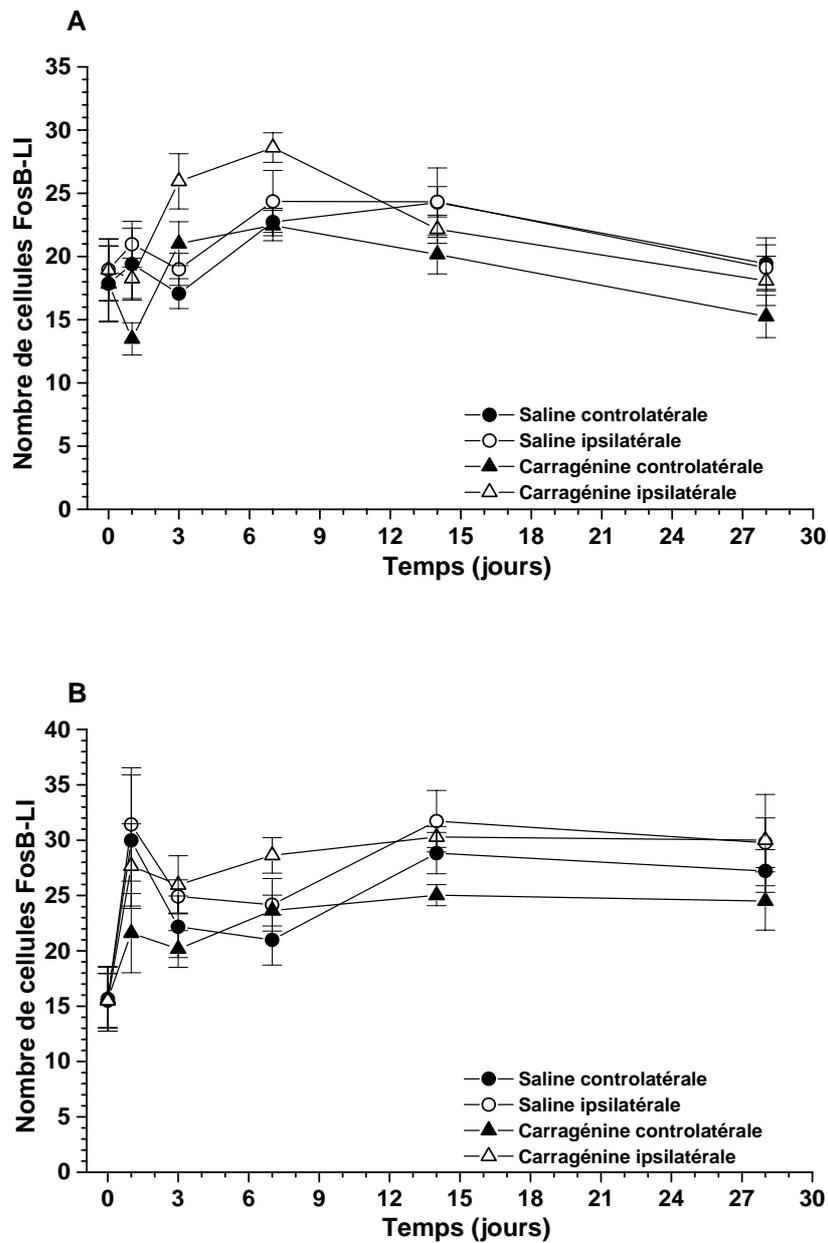


Figure 48. Nombre de cellules FosB-LI au niveau spinal L1 au cours du temps après injection intraplantaire de carragénine ou solution saline. A) Couches superficielles. B) Couches profondes. Moyenne  $\pm$  erreur type.

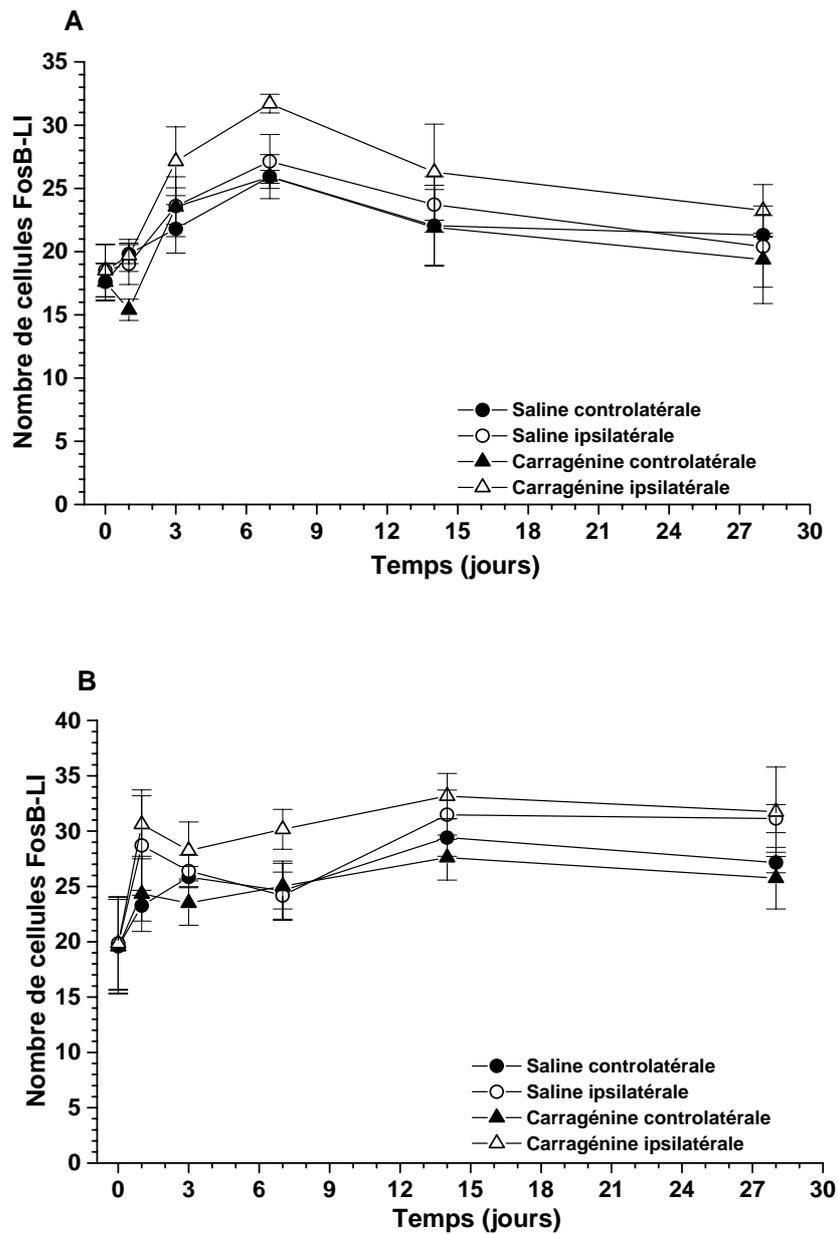


Figure 49. Nombre de cellules FosB-LI au niveau spinal L2 au cours du temps après injection intraplantaire de carragénine ou solution saline. A) Couches superficielles. B) Couches profondes. Moyenne  $\pm$  erreur type.

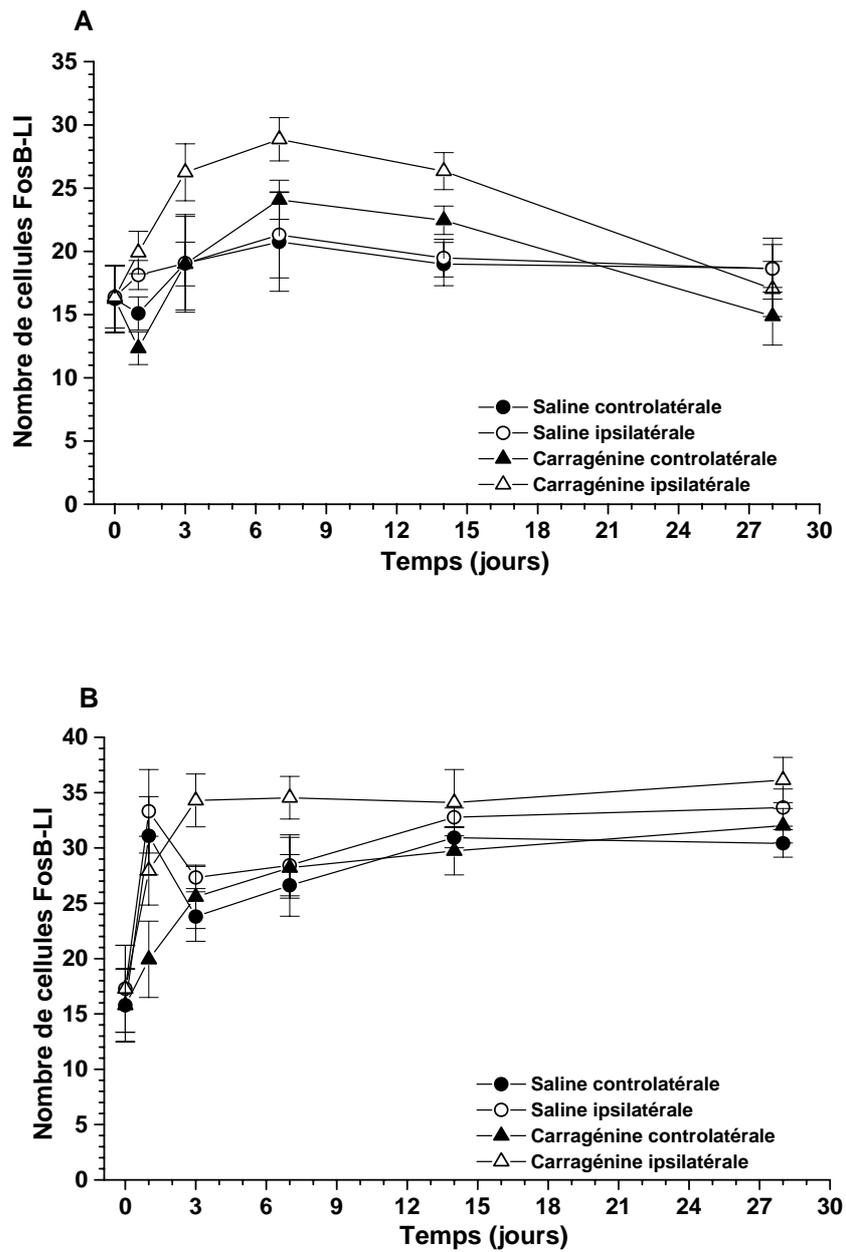


Figure 50. Nombre de cellules FosB-LI au niveau spinal L3 au cours du temps après injection intraplantaire de carragénine ou solution saline. A) Couches superficielles. B) Couches profondes. Moyenne  $\pm$  erreur type.

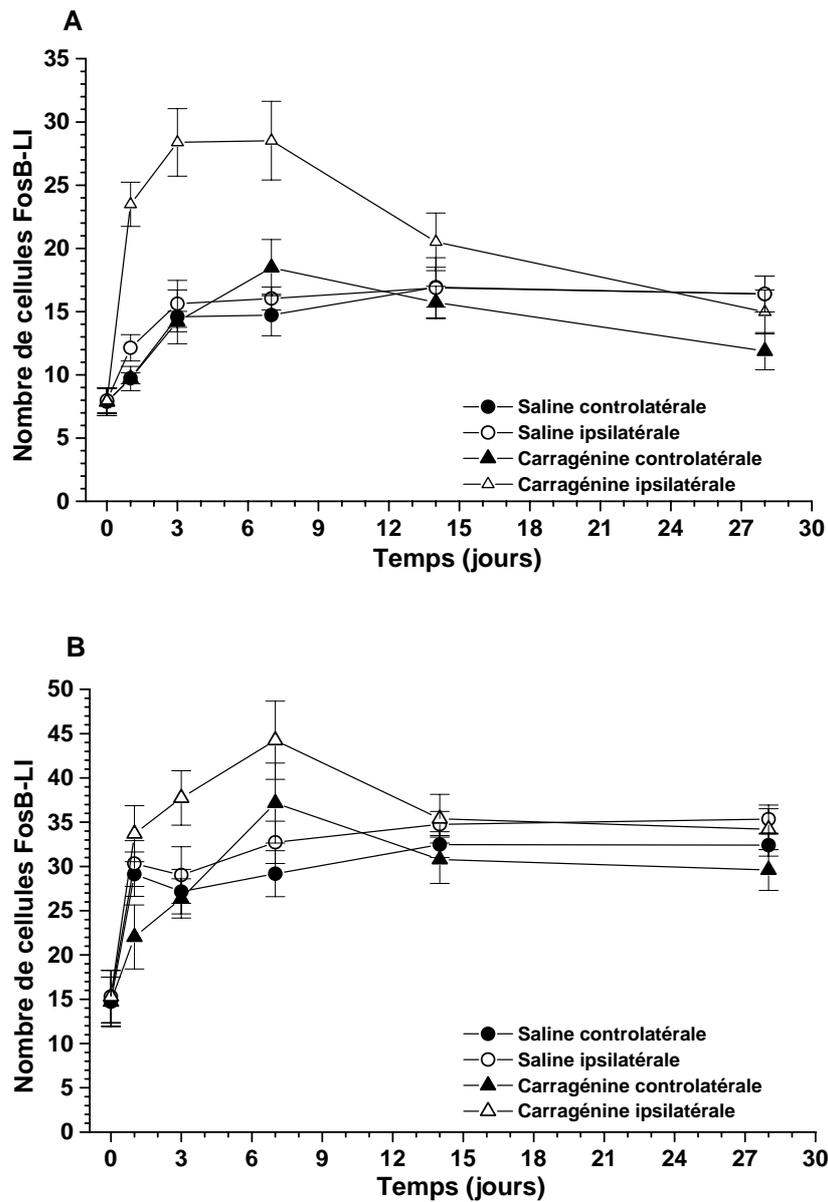


Figure 51. Nombre de cellules FosB-LI au niveau spinal L4 au cours du temps après injection intraplantaire de carragénine ou solution saline. A) Couches superficielles. B) Couches profondes. Moyenne  $\pm$  erreur type.

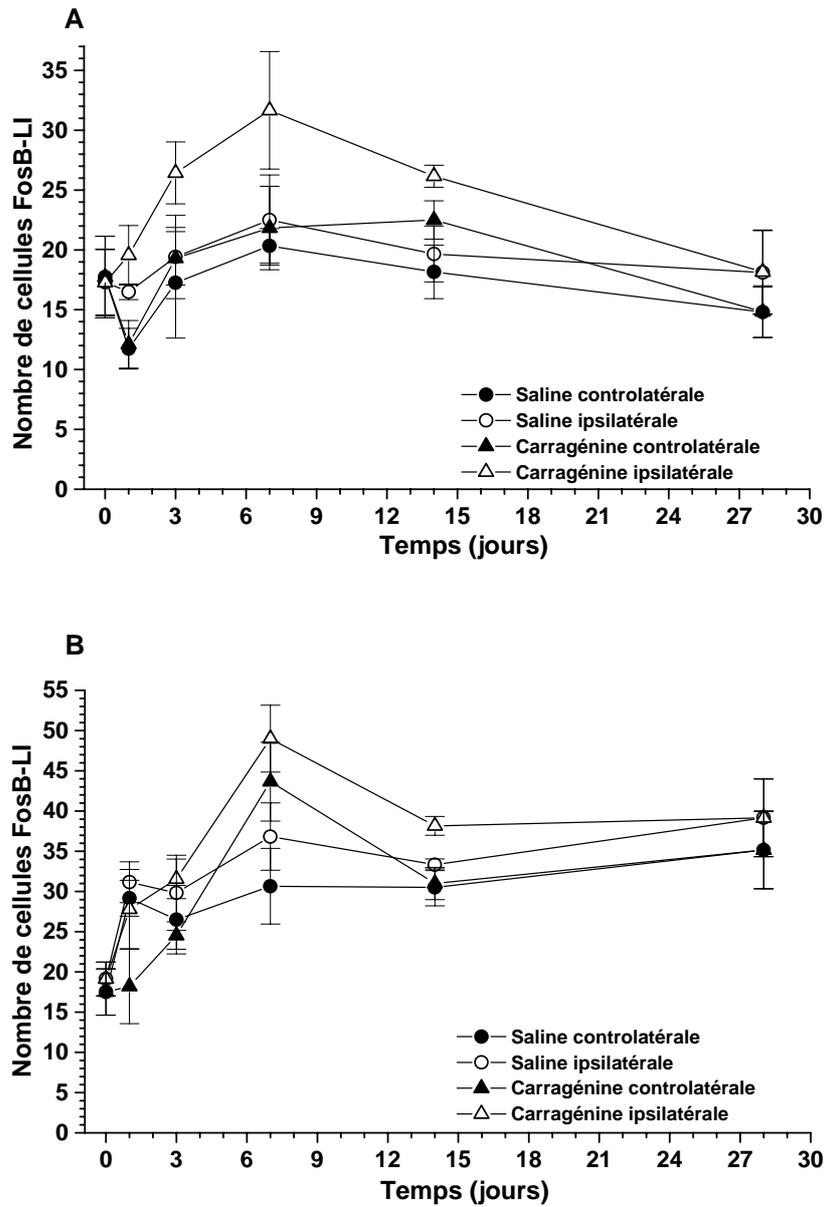


Figure 52. Nombre de cellules FosB-LI au niveau spinal L5 au cours du temps après injection intraplantaire de carragénine ou solution saline. A) Couches superficielles. B) Couches profondes. Moyenne  $\pm$  erreur type.

#### 4. GLOSSAIRE

**Affectif** : qui concerne les états de plaisir ou de douleur (simples : affects, sensations ; ou complexes : émotions, passions, sentiments).

**Algodystrophie**: trouble trophique s'accompagnant des douleurs.

**Algogène**: qui provoque la douleur.

**Allodynie**: douleur causée par une stimulation qui n'est pas normalement douloureuse.

**Analgésie**: absence de douleur en réponse à un stimulus normalement douloureux.

**Anesthésie**: absence de toute modalité sensorielle.

**ApoTome**: module qui peut s'ajouter au microscope à fluorescence. Monté dans un colulisseau, il est simplement inséré dans le plan du diaphragme de champ du trajet épiscopique. La technologie du module Apo Tome repose sur le principe de l'illumination structurée. L'image d'une grille est projetée dans le plan focal de la préparation et est déplacée dans trois positions bien définies, ce que permet de supprimer le flou résultant de la profondeur de champ.

**Caudal** : postérieur, que se rapporte à la partie terminale d'un organe.

**Causalgie**: sensation de brûlure lancinante dans une région du peu, exacerbé par un contact même léger avec des objets, parfois accompagnée de troubles trophiques

**Champ récepteur**: territoire cutané susceptible de déterminer l'excitation de un récepteur.

**Cognitif**: qualifie les processus par lesquels un organisme acquiert des informations sur l'environnement et les élabore pour régler son comportement : perception, formation de concepts, raisonnement, langage, décision, pensée.

**Comportement**: ensemble des réactions objectivement observables.

**Dermatome**: surface cutanée innervée par les fibres sensitives d'un seul nerf rachidien

**Dorsal**: du côté du dos,

**Douleur**: expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, liée à une lésion tissulaire existante ou potentielle, ou écrite en termes évoquant une telle lésion.

**Douleur chez l'animal**: expérience sensorielle aversive, qu'évoque dans la conscience de l'animal le danger ou la menace à l'intégrité de ses tissus. Ce que changes la physiologie et le comportement de l'animal pour éviter ou réduire la lésion, en diminuant la probabilité de son occurrence et en promouvant la guérison.

**Douleur centrale:** douleur provenant ou causée par une lésion ou un dysfonctionnement du système nerveux central.

**Douleur de neuropathie:** douleur provenant ou causée par une lésion ou un dysfonctionnement situés au niveau du système nerveux central ou périphérique.

**Douleur neurogène:** douleur provenant ou causée par une lésion, un dysfonctionnement ou une perturbation transitoire situés au niveau du système nerveux périphérique ou central.

**Douleur somatique:** douleur provenant du corps, peau, os, muscles et tendons.

**Douleur viscérale:** douleur provenant des organes internes, cœur, poumons, foie, intestins, organes de la reproduction

**Emotion:** état affectif intense, caractérisé par une brusque perturbation physique et mentale où sont abolies, en présence de certaines excitations ou représentation très vives, les réactions appropriées d'adaptation à l'événement.

**Fidélité / reproductibilité d'un test:** caractéristique telle que le test fournit des résultats à peu près identiques lorsqu'il est répété dans le temps à un même sujet dont l'état ne s'est pas modifié entre les deux essais.

**Fibromyalgie:** Syndrome associant des douleurs diffuses chroniques, mobiles avec enraidissement matinal et à prédominance axiale, touchant surtout les insertions tendineuses et les muscles.

**Hyperalgésie:** réponse douloureuse exagérée à un stimulus normalement douloureux.

**Hyperalgésie primaire:** se caractérise par un seuil à la douleur bas, sensibilité augmenté à la stimulation sus-seuil et douleur spontanée dans le site de la lésion.

**Hyperalgésie secondaire:** se caractérise par la présence d'hyperalgésie et allodynie dans une plus grande aire qui entoure le site de la lésion.

**Hyperesthésie:** sensibilité exagérée à une stimulation, à l'exception des sensations spécifiques.

**Hyperpathie:** syndrome douloureux caractérisé par une réaction anormalement douloureuse à un stimulus et dont le seuil est augmenté.

**Hypoalgésie:** réponse douloureuse diminuée à un stimulus normalement douloureux.

**Myofascial:** en rhumatologie point douloureux qui se rapporte à un muscle et à une aponévrose.

**Neuropathie:** perturbation de la fonction ou modification pathologique d'un nerf du système nerveux périphérique. Au niveau d'un seul nerf = mononeuropathie, au niveau de plusieurs nerfs = mononeuropathie multiple, en cas d'atteinte diffuse ou bilatérale = polyneuropathie.

**Névralgie:** douleur survenant dans un ou plusieurs territoires nerveux.

**Névrite:** inflammation d'un ou plusieurs nerfs.

**Niveau de tolérance à la douleur:** le niveau plus haut de douleur qu'un sujet est préparé à tolérer.

**Nocicepteur:** récepteur préférentiellement sensible à un stimulus capable de produire une lésion tissulaire ou que devient délétère s'il est prolongé.

**Nociceptif, ive:** se dit d'une excitation nerveuse qui provoque une sensation douloureuse, ou de la réaction provoquée par une telle excitation.

**Nociception:** sensibilité aux stimulations d'intensité élevée, susceptibles de menacer l'intégrité physique de l'organisme.

**Plasticité:** désigne des changements fonctionnels ou structuraux du système nerveux.

**Résonance Paramagnétique Electronique** cette technique consiste à exciter les électrons par une onde émise dans un champ magnétique et à étudier le signal de réponse des électrons.

**Récepteur:** structure cellulaire spécialisée qui sert d'interface entre l'énergie physique du stimulus et le système sensoriel.

**Rostral:** antérieur, qui se rapporte à un rostre.

**Sensibilité au changement:** qualité d'un instrument d'évaluation dont le score, chez un sujet donné, varie nettement lorsque le phénomène mesuré change.

**Sensibilisation:** se caractérise par une sensibilité accrue des terminaisons nerveuses, due à la stimulation répétée. Elle se traduit par une baisse du seuil à la stimulation et réponse augmenté et prolongé à la stimulation après décharge.

**Sensori-discriminatif:** correspond au caractère qualitatif de la douleur (piqûre, brûlure, torsion) mais aussi à sa durée, son intensité et sa localisation.

**Seuil douloureux:** expérience douloureuse la plus faible qu'un sujet puisse identifier comme telle.

**Souffrance:** état de détresse sévère associée à des événements qui menacent l'intégrité de la personne ou considéré comme tels. Il peut être ou non associé à la douleur.

**Validation:** processus général d'étude des différentes qualités métrologiques d'un instrument : validité, fidélité, sensibilité au changement. Le processus de validation aboutit à décréter qu'un instrument est validé ou non.

**Validé (instrument):** se dit d'un instrument dont a vérifié les trois qualités métrologiques (validité, fidélité, sensibilité au changement).

**Validité:** aptitude d'un instrument à mesurer exactement ce qu'il est censé mesurer. On dit alors qu'il est valide.

**Ventral:** du côté du ventre.

**Zona:** dermatose aiguë caractérisée par une éruption de vésicules sur fond érythémateux, disposées par groupes sur le trajet d'un nerf sensitif. Des douleurs névralgiques peuvent accompagner l'éruption.

## VII. Bibliographie

*La bibliographie du plaisir est aussi pauvre  
que celle de la douleur est riche.*

*Georges Dumas*

Extrait du *Nouveau traité de psychologie*

## VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agnello D**, Wang H, Yang H, Tracey KJ, Ghezzi P (2002) HMGB-1, a DNA-binding protein with cytokine activity, induces brain TNF and IL-6 production, and mediates anorexia and taste aversion. *Cytokine* 18:231-236.
- Aley KO**, McCarter G, Levine JD (1998) Nitric oxide signaling in pain and nociceptor sensitization in the rat. *J Neurosci* 18:7008-7014.
- Andersson M**, Westin JE, Cenci MA (2003) Time course of striatal DeltaFosB-like immunoreactivity and prodynorphin mRNA levels after discontinuation of chronic dopaminomimetic treatment. *Eur J Neurosci* 17:661-666.
- Anseloni VC**, Ennis M, Lidow MS (2003) Optimization of the mechanical nociceptive threshold testing with the Randall-Selitto assay. *J Neurosci Methods* 131:93-97.
- Apkarian AV**, Hodge CJ. (1989) Primate spinothalamic pathways: I. A quantitative study of the cells of origin of the spinothalamic pathway. *J Comp Neurol* 288:447-73.
- Arnett HA**, Hellendall RP, Matsushima GK, Suzuki K, Laubach VE, Sherman P, Ting JP (2002) The protective role of nitric oxide in a neurotoxicant-induced demyelinating model. *J Immunol* 168:427-433.
- Bajrović F**, Sketelj J (1998) Extent of nociceptive dermatomes in adult rats is not primarily maintained by axonal competition. *Exp Neurol* 150:115-121.
- Basbaum AI**, Fields HL (1984) Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci* 7:309-338.
- Battaglia AA**, Sehayek K, Grist J, McMahon SB, Gavazzi I (2003) EphB receptors and ephrin-B ligands regulate spinal sensory connectivity and modulate pain processing. *Nat Neurosci* 6:339-340.
- Bernard JF**, Besson JM. (1990) The spino(trigemino)pontoamygdaloid pathway: electrophysiological evidence for an involvement in pain processes. *J Neurophysiol* 63:473-90.
- Bernard JF**, Bester H, Besson JM (1996) Involvement of the spino-parabrachio -amygdaloid and -hypothalamic pathways in the autonomic and affective emotional aspects of pain. *Prog Brain Res* 107:243-255.
- Berrazueta JR**, Lopez-Jaramillo P, Moncada S (1992) Blockade of the peripheral pain sensory system via the L-arginine: nitric oxide: cyclic GMP pathway. Dans *Biology of Nitric oxide* 258-60.

- Bhatia M**, Sidhapuriwala J, Moochhala SM, Moore PK (2005) Hydrogen sulphide is a mediator of carrageenan-induced hindpaw oedema in the rat. *Br J Pharmacol* 145:141-144.
- Bian D**, Ossipov MH, Zhong C, Malan TP, Jr., Porreca F (1998) Tactile allodynia, but not thermal hyperalgesia, of the hindlimbs is blocked by spinal transection in rats with nerve injury. *Neurosci Lett* 241:79-82.
- Bogdan C** (2001) Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol* 11:66-75.
- Bogdanov M B**, Wurtman RJ (1997) Possible involvement of nitric oxide in NMDA-induced glutamate release in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *Neurosci Lett.* 221: 197-201.
- Bonica JJ** (1990) "Basic considerations of pain". Dans: *The Management of pain* (JJ Bonica ed), 2<sup>nd</sup> ed. Vol.1 pp.1-94, Philadelphia. Lea & Febiger.
- Boureau F** (2001) «Sémiologie de la douleur». Dans: *Douleurs aiguës douleurs chroniques soins palliatifs*. (CNEUD, CNMD, SFAP ed), pp 15-38, Paris Med-line éditions.
- Bourgeois L**, Monconduit L, Villanueva L, Bernard JF (2001a) Parabrachial internal lateral neurons convey nociceptive messages from the deep laminae of the dorsal horn to the intralaminar thalamus. *J Neurosci* 21:2159-2165.
- Bourgeois L**, Gauriau C, Bernard JF (2001b) Projections from the nociceptive area of the central nucleus of the amygdala to the forebrain: a PHA-L study in the rat. *Eur J Neurosci* 14:229-255.
- Bradley PP**, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G (1982) Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 78:206-209.
- Budzinski M**, Misterek K, Gumulka W, Dorociak A (2000) Inhibition of inducible nitric oxide synthase in persistent pain. *Life Sci* 66:301-305.
- Bullitt E** (1990) Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol* 296: 517-30.
- Burgaud JL**, Ongini E, Del Soldato P (2002a) Nitric oxide-releasing drugs: a novel class of effective and safe therapeutic agents. *Ann N Y Acad Sci* 962:360-371.
- Burgaud JL**, Riffaud JP, Del Soldato P (2002b) Nitric-oxide releasing molecules: a new class of drugs with several major indications. *Curr Pharm Des* 8:201-213.
- Buritova J**, Chapman V, Honore P, Besson JM (1996) The contribution of GABAB receptor-mediated events to inflammatory pain processing: carrageenan oedema and associated spinal c-Fos expression in the rat. *Neuroscience* 73:487-496.

- Buritova J**, Chapman V, Honore P, Besson JM (1997) The contribution of peripheral bradykinin B2 receptors to carrageenan-evoked oedema and spinal c-Fos expression in rats. *Eur J Pharmacol* 320:73-80.
- Callsen-Cencic P**, Hoheisel U, Kaske A, Mense S, Tenschert S (1999) The controversy about spinal neuronal nitric oxide synthase: under which conditions is it up- or downregulated? *Cell Tissue Res* 295:183-194.
- Carstens E**, Moberg GP (2000) Recognizing pain and distress in laboratory animals. *Ilar J* 41:62-71.
- Catheline G**, Le Guen S, Honore P, Besson JM (1999) Are there long-term changes in the basal or evoked Fos expression in the dorsal horn of the spinal cord of the mononeuropathic rat? *Pain* 80:347-357.
- Celerier E**, Laulin JP, Corcuff JB, Le Moal M, Simonnet G (2001) Progressive enhancement of delayed hyperalgesia induced by repeated heroin administration: a sensitization process. *J Neurosci* 21:4074-4080.
- Chang CI**, Liao JC, Kuo L (1998) Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *Am J Physiol* 274:H342-348.
- Chaplan SR**, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53:55-63.
- Chen AF**, O'Brien T, Katusic ZS (1998) Transfer and expression of recombinant nitric oxide synthase genes in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol Sci* 19:276-286.
- Chen J**, Kelz MB, Hope BT, Nakabeppu Y, Nestler EJ (1997) Chronic Fos-related antigens: stable variants of deltaFosB induced in brain by chronic treatments. *J Neurosci* 17:4933-4941.
- Chen J**, Zhang Y, Kelz MB, Steffen C, Ang ES, Zeng L, Nestler EJ (2000) Induction of cyclin-dependent kinase 5 in the hippocampus by chronic electroconvulsive seizures: role of [Delta]FosB. *J Neurosci* 20:8965-8971.
- Chen X**, Levine JD (1999) NOS inhibitor antagonism of PGE2-induced mechanical sensitization of cutaneous C-fiber nociceptors in the rat. *J Neurophysiol* 81:963-966.
- Cholet N**, Seylaz J, Lacombe P, Bonvento G (1997) Local uncoupling of the cerebrovascular and metabolic responses to somatosensory stimulation after neuronal nitric oxide synthase inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:1191-1201.
- Chung YH**, Kim D, Lee KJ, Kim SS, Kim KY, Cho DY, Sohn DS, Lee WB (2005) Immunohistochemical study on the distribution of neuronal nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in the spinal cord of aged rat. *J Mol Histol* 36:325-329.
- Clanton TL** (1998) Invited editorial/introduction to nitric oxide and the respiratory musculature: A short history of nitric oxide in skeletal muscle function. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 119:165-166.

- Coderre TJ**, Katz J, Vaccarino AL, Melzack R (1993) Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain* 52:259-285.
- Coghill RC**, Sang CN, Maisog JM, Iadarola MJ (1999) Pain intensity processing within the human brain: a bilateral, distributed mechanism. *J Neurophysiol* 82:1934-43
- Covington EC** (2000) The Biological basis of pain. *International Review of psychiatry*. 12:128-147.
- Craig AD** (2002) How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *Nat Rev Neurosci* 3: 655-66.
- Craig AD** (2003) A new view of pain as a homeostatic emotion. *Trends Neurosci* 26: 303-7.
- Craig AD**, Sorkin, LS (2005) Pain and Analgesia. *Encyclopedia of life sciences*: 1-9.
- Cui JG**, Meyerson BA, Linderoth B (1999) Opposite effects of spinal cord stimulation in different phases of carrageenan-induced hyperalgesia. *Eur J Pain* 3:365-374.
- D'Amour FE**, Smith DL (1941) A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther* 72: 74-79.
- Desbois C**, Villanueva L (2001) The organization of lateral ventromedial thalamic connections in the rat: a link for the distribution of nociceptive signals to widespread cortical regions. *Neuroscience* 102:885-898.
- Dinh-Xuan AT** (1998) Nobel 998: la part belle au NO. *Médecine Sciences* 14:1297-1299.
- Di Rosa M**, Giroud JP, Willoughby DA (1971) Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Pathol* 104: 15-29.
- Di Rosa M** (1972) Biological properties of carrageenan. *J Pharm Pharmacol* 24: 89-102.
- Dobrazanski P**, Noguchi T, Kovary K, Rizzo CA, Lazo PS, Bravo R (1991) Both products of the fosB gene, FosB and its short form, FosB/SF, are transcriptional activators in fibroblasts. *Mol Cell Biol* 11:5470-5478.
- Dolan S**, Field LC, Nolan AM (2000) The role of nitric oxide and prostaglandin signaling pathways in spinal nociceptive processing in chronic inflammation. *Pain* 86:311-320.
- Draisci G**, Iadarola M (1989) Temporal analysis of increases in c-fos, preprodynorphin and preproenkephalin mRNAs in rat spinal cord. *Brain Res Mol Brain Res* 6 : 31-7.
- Dray A** (1995) Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth* 75:125-131.
- Duarte ID**, dos Santos IR, Lorenzetti BB, Ferreira SH (1992) Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol* 217:225-227.

- Dubner R**, Ruda MA (1992) Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. *Trends Neurosci* 15:96-103.
- Dubner R** (1994) "Methods of assessing pain in animals". Dans: *Textbook of pain*. Melzack R, Wall PD, eds. London: Churchill Livingstone.
- Dun NJ**, Dun SL, Förstermann U, Tseng LF (1992) Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat spinal cord. *Neurosci Lett* 147: 217-220.
- Eckert WA**, 3rd, McNaughton KK, Light AR (2003) Morphology and axonal arborization of rat spinal inner lamina II neurons hyperpolarized by mu-opioid-selective agonists. *J Comp Neurol* 458:240-256.
- Esplugues JV** (2002) NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br J Pharmacol* 135:1079-1095.
- Ferreira SH**, Lorenzetti BB, Faccioli LH (1992) Blockade of hyperalgesia and neurogenic oedema by topical application of nitroglycerin. *Eur J Pharmacol* 217:207-209.
- Forstermann U**, Gath I, Schwarz P, Closs EI, Kleinert H (1995) Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem Pharmacol* 50:1321-1332.
- Furchgott RF**, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376.
- Furst S** (1999) Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res Bull* 48:129-141.
- Gamboa-Esteves FO**, Lima D, Batten TF (2001) Neurochemistry of superficial spinal neurones projecting to nucleus of the solitary tract that express c-fos on chemical somatic and visceral nociceptive input in the rat. *Metab Brain Dis* 16:151-164.
- Gao WC**, Qiao JT (1998) Nitric oxide contributes to both spinal nociceptive transmission and its descending inhibition in rats: an immunocytochemical study. *Neurosci Lett* 240:143-146.
- Gauriau C**, Bernard JF (2002) Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Exp Physiol* 87:251-258.
- Gentili ME**, Mazoit JX, Samii KK, Fletcher D (1999) The effect of a sciatic nerve block on the development of inflammation in carrageenan injected rats. *Anesth Analg* 89:979-984.
- Gilron I**, Biederman J, Jhamandas K, Hong M (2003) Gabapentin blocks and reverses antinociceptive morphine tolerance in the rat paw-pressure and tail-flick tests. *Anesthesiology* 98:1288-1292.
- Goff JR**, Burkey AR, Goff DJ, Jasmin L (1998) Reorganization of the spinal dorsal horn in models of chronic pain: correlation with behaviour. *Neuroscience* 82:559-574.

- Grant G** (1995) "Primary afferents projections to the spinal cord". Dans: Paxinos G, editor. *The rat nervous system*. 2<sup>nd</sup> ed. pp. 61-66, Australia: Academic Press.
- Grisel JE**, Wiertelak EP, Watkins LR, Maier SF (1994) Route of morphine administration modulates conditioned analgesic tolerance and hyperalgesia. *Pharmacol Biochem Behav* 49:1029-1035.
- Groves JT**, Wang CC (2000) Nitric oxide synthase: models and mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* 4:687-695.
- Gualillo O**, Eiras S, Lago F, Dieguez C, Casanueva FF (2000) Elevated serum leptin concentrations induced by experimental acute inflammation. *Life Sci* 67:2433-2441.
- Guhring H**, Tegeder I, Lotsch J, Pahl A, Werner U, Reeh PW, Rehse K, Brune K, Geisslinger G (2001) Role of nitric oxide in zymosan induced paw inflammation and thermal hyperalgesia. *Inflamm Res* 50:83-88.
- Haby C**, Lisovoski F, Aunis D, Zwiller J (1994) Stimulation of the cyclic GMP pathway by NO induces expression of the immediate early genes c-fos and junB in PC12 cells. *J Neurochem* 62:496-501.
- Haley JE**, Dickenson AH, Schachter M (1992) Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. *Neuropharmacology* 31:251-258.
- Han JS**, Bird GC, Li W, Jones J, Neugebauer V (2005) Computerized analysis of audible and ultrasonic vocalizations of rats as a standardized measure of pain-related behavior. *J Neurosci Methods* 141:261-269.
- Hargreaves K**, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J (1988) A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32:77-88.
- Harris JA** (1998) Using c-fos as a neural marker of pain. *Brain Res Bull* 45:1-8.
- Hay C**, de Belleruche J (1997) Carrageenan-induced hyperalgesia is associated with increased cyclo-oxygenase-2 expression in spinal cord. *Neuroreport* 8:1249-1251.
- Hedo G**, Laird JM, Lopez-Garcia JA (1999) Time-course of spinal sensitization following carrageenan-induced inflammation in the young rat: a comparative electrophysiological and behavioural study in vitro and in vivo. *Neuroscience* 92:309-318.
- Hellermann GR**, Solomonson LP (1997) Calmodulin promotes dimerization of the oxygenase domain of human endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 272:12030-12034.
- Hemish J**, Nakaya N, Mittal V, Enikolopov G (2003) Nitric oxide activates diverse signaling pathways to regulate gene expression. *J Biol Chem* 278:42321-42329.
- Herdegen T**, Tolle TR, Bravo R, Zieglgansberger W, Zimmermann M (1991) Sequential expression of JUN B, JUN D and FOS B proteins in rat spinal neurons: cascade of transcriptional operations during nociception. *Neurosci Lett* 129:221-224.

- Herdegen T**, Rudiger S, Mayer B, Bravo R, Zimmermann M (1994) Expression of nitric oxide synthase and colocalisation with Jun, Fos and Krox transcription factors in spinal cord neurons following noxious stimulation of the rat hindpaw. *Brain Res Mol Brain Res* 22:245-258.
- Herdegen T**, Leah JD (1998) Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev* 28:370-490.
- Hiroi N**, Brown JR, Haile CN, Ye H, Greenberg ME, Nestler EJ (1997) FosB mutant mice: loss of chronic cocaine induction of Fos-related proteins and heightened sensitivity to cocaine's psychomotor and rewarding effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10397-10402.
- Hiroi N**, Marek GJ, Brown JR, Ye H, Saudou F, Vaidya VA, Duman RS, Greenberg ME, Nestler EJ (1998) Essential role of the fosB gene in molecular, cellular, and behavioral actions of chronic electroconvulsive seizures. *J Neurosci* 18:6952-6962.
- Honoré P**, Chapman V, Buritova J, Besson JM (1995) Reduction of carrageenin oedema and the associated c-Fos expression in the rat lumbar spinal cord by nitric oxide synthase inhibitor. *Br J Pharmacol* 114:77-84.
- Honoré P**, Catheline G, Le Guen S, Besson JM (1997) Chronic treatment with systemic morphine induced tolerance to the systemic and peripheral antinociceptive effects of morphine on both carrageenin induced mechanical hyperalgesia and spinal c-Fos expression in awake rats. *Pain* 71:99-108.
- Honoré P**, Menning PM, Rogers SD, Nichols ML, Mantyh PW (2000) Neurochemical plasticity in persistent inflammatory pain. *Prog Brain Res* 129:357-363.
- Hope B**, Kosofsky B, Hyman SE, Nestler EJ (1992) Regulation of immediate early gene expression and AP-1 binding in the rat nucleus accumbens by chronic cocaine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5764-5768.
- Hope BT**, Kelz MB, Duman RS, Nestler EJ (1994a) Chronic electroconvulsive seizure (ECS) treatment results in expression of a long-lasting AP-1 complex in brain with altered composition and characteristics. *J Neurosci* 14:4318-4328.
- Hope BT**, Nye HE, Kelz MB, Self DW, Iadarola MJ, Nakabeppu Y, Duman RS, Nestler EJ (1994b) Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments. *Neuron* 13:1235-1244.
- Hughes P**, Dragunow M (1995) Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacol Rev* 47:133-178.
- Hunt SP**, Pini A, Evan G (1987) Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 328:632-634.

- Hunter JC**, Woodburn VL, Durieux C, Pettersson EK, Poat JA, Hughes J (1995) c-fos antisense oligodeoxynucleotide increases formalin-induced nociception and regulates preprodynorphin expression. *Neuroscience* 65:485-492.
- Hurley JV**, Willoughby DA (1973) Acute inflammation--a combined topographical and electron microscopic study of the mode of action of carrageenan. *Pathology* 5:9-21.
- Idriss SD**, Gudi T, Casteel DE, Kharitonov VG, Pilz RB, Boss GR (1999) Nitric oxide regulation of gene transcription via soluble guanylate cyclase and type I cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 274:9489-9493.
- Ignarro LJ**, Cirino G, Casini A, Napoli C (1999) Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 34:879-886.
- Inoue D**, Kido S, Matsumoto T (2004) Transcriptional induction of FosB/DeltaFosB gene by mechanical stress in osteoblasts. *J Biol Chem* 279:49795-49803.
- Jergova S**, Cizkova D, Orendacova J, Cizek M, Marsala J (2002) Localization of c-Fos protein in the rat spinal cord after carrageenan treatment. *Acta Histochem* 104:381-385.
- Jergova S**, Cizkova D (2005) Long-term changes of c-Fos expression in the rat spinal cord following chronic constriction injury. *Eur J Pain* 9:345-354.
- Jones SL**, Gebhart GF (1987) Spinal pathways mediating tonic, coeruleospinal, and raphe-spinal descending inhibition in the rat. *J Neurophysiol* 58:138-159.
- Julius D**, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413:203-210.
- Kaczmarek L** (1992) Expression of c-fos and other genes encoding transcription factors in long-term potentiation. *Behav Neural Biol* 57: 263-6.
- Kawamata T**, Omote K (1999) Activation of spinal N-methyl-D-aspartate receptors stimulates a nitric oxide/cyclic guanosine 3,5-monophosphate/glutamate release cascade in nociceptive signaling. *Anesthesiology* 91:1415-1424.
- Keeble JE**, Moore PK (2002) Pharmacology and potential therapeutic applications of nitric oxide-releasing non-steroidal anti-inflammatory and related nitric oxide-donating drugs. *Br J Pharmacol* 137:295-310.
- Keilhoff G**, Reiser M, Stanarius A, Aoki E, Wolf G (2000) Citrulline immunohistochemistry for demonstration of NOS activity in vivo and in vitro. *Nitric Oxide* 4:343-353.
- Kelm M** (1999) Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta* 1411:273-289.
- Kelz MB**, Chen J, Carlezon WA, Jr., Whisler K, Gilden L, Beckmann AM, Steffen C, Zhang YJ, Marotti L, Self DW, Tkatch T, Baranauskas G, Surmeier DJ, Neve RL, Duman RS, Picciotto MR, Nestler EJ (1999) Expression of the transcription factor deltaFosB in the brain controls sensitivity to cocaine. *Nature* 401:272-276.

- Kelz MB**, Nestler EJ (2000) deltaFosB: a molecular switch underlying long-term neural plasticity. *Curr Opin Neurol* 13:715-720.
- Kendrick KM**, Guevara-Guzman R, Zorrilla J, Hinton MR, Broad KD, Mimmack M, Ohkura S (1997) Formation of olfactory memories mediated by nitric oxide. *Nature* 388:670-674.
- Kissin I**, Lee SS, Bradley EL, Jr. (1998) Effect of prolonged nerve block on inflammatory hyperalgesia in rats: prevention of late hyperalgesia. *Anesthesiology* 88:224-232.
- Kleschyov AL**, Mollnau H, Oelze M, Meinertz T, Huang Y, Harrison DG, Munzel T (2000) Spin trapping of vascular nitric oxide using colloid Fe(II)-diethyldithiocarbamate. *Biochem Biophys Res Commun* 275:672-677.
- Koltzenburg M** (1995) Stability and plasticity of nociceptor function and their relationship to provoked and ongoing pain. *Seminars in Neurosci* 7:199-210.
- Koltzenburg M**, Wall PD, McMahon SB (1999) Does the right side know what the left is doing? *Trends Neurosci* 22:122-127.
- Kroncke KD**, Fehsel K, Kolb-Bachofen V (1997) Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where? *Nitric Oxide* 1:107-120.
- Lam HH**, Hanley DF, Trapp BD, Saito S, Raja S, Dawson TM, Yamaguchi H (1996) Induction of spinal cord neuronal nitric oxide synthase (NOS) after formalin injection in the rat hind paw. *Neurosci Lett* 210:201-204.
- Lanteri-Minet M**, de Pommery J, Herdegen T, Weil-Fugazza J, Bravo R, Menetrey D (1993) Differential time course and spatial expression of Fos, Jun, and Krox-24 proteins in spinal cord of rats undergoing subacute or chronic somatic inflammation. *J Comp Neurol* 333:223-235.
- Laulin JP**, Larcher A, Celerier E, Le Moal M, Simonnet G (1998) Long-lasting increased pain sensitivity in rat following exposure to heroin for the first time. *Eur J Neurosci* 10:782-785.
- Laulin JP**, Celerier E, Larcher A, Le Moal M, Simonnet G (1999) Opiate tolerance to daily heroin administration: an apparent phenomenon associated with enhanced pain sensitivity. *Neuroscience* 89:631-636.
- Laulin JP**, Maurette P, Corcuff JB, Rivat C, Chauvin M, Simonnet G (2002) The role of ketamine in preventing fentanyl-induced hyperalgesia and subsequent acute morphine tolerance. *Anesth Analg* 94:1263-1269.
- Lawrence T**, Willoughby DA, Gilroy DW (2002) Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2:787-795.
- Lazo PS**, Dorfman K, Noguchi T, Mattei MG, Bravo R (1992) Structure and mapping of the fosB gene. FosB downregulates the activity of the fosB promoter. *Nucleic Acids Res* 20:343-350.

- Le Bars D**, Dickenson AH, Besson JM, Villanueva L (1986) Aspects of sensory processing through convergent neurons. In Yaksh TL (ed): *Spinal afferent processing*. Plenum, New York, pp 467-504.
- Le Bars D**, Bouhassira D, Villanueva L (1995) "Opioids and Diffuse Noxious Inhibitory Control (DNIC) in the rat". *Pain and the Brain: From Nociception to Cognition*. Edited by B Bromm and J E Desmedt. Advances in Pain Research and Therapy. Vol. 22. Raven Press, Ltd., New York, pp 517-539.
- Le Bars D**, Gozariu M, Cadden SW (2001) Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 53:597-652.
- Le Bars D**, Plaghki L (2001) «Bases anatomiques, physiologiques et psychologiques» dans: *Douleurs aiguës douleurs chroniques soins palliatifs*. (CNEUD, CNMD, SFAP ed), pp 41-80, Paris Med-line editions.
- Le Bars D**, Willer JC (2004) Physiologie de la douleur. Encyclopédie Médico-Chirurgicale 36-020-A-10. Anesthésie-Réanimation 1-28.
- Le Bars D**, Cadden SW (2005) "Pain". Dans Whishaw IQ, Kolb B (ed): *The Behavior of the laboratory rat: A handbook with tests*. pp 69-80, New York, Oxford.
- Lee JH**, Wilcox GL, Beitz AJ (1992) Nitric oxide mediates Fos expression in the spinal cord induced by mechanical noxious stimulation. *Neuroreport* 3:841-844.
- Lee JH**, Price RH, Williams FG, Mayer B, Beitz AJ (1993) Nitric oxide synthase is found in some spinothalamic neurons and in neuronal processes that appose spinal neurons that express Fos induced by noxious stimulation. *Brain Res* 608:324-333.
- Le Guen S**, Catheline G, Fournie-Zaluski MC, Roques BP, Besson JM, Buritova J (2003) Further evidence for the interaction of mu- and delta-opioid receptors in the antinociceptive effects of the dual inhibitor of enkephalin catabolism, RB101(S). A spinal c-Fos protein study in the rat under carrageenin inflammation. *Brain Res* 967:106-112.
- Leong S**, Liu H, Yeo J (2000) Nitric oxide synthase and glutamate receptor immunoreactivity in the rat spinal trigeminal neurons expressing Fos protein after formalin injection. *Brain Res* 855:107-115.
- Levin S**, Pearsall G, Ruderman RJ (1978) Von Frey's method of measuring pressure sensibility in the hand: an engineering analysis of the Weinstein-Semmes pressure aesthesiometer. *J Hand Surg [Am]* 3:211-216.
- Levy D**, Zochodne DW (1998) Local nitric oxide synthase activity in a model of neuropathic pain. *Eur J Neurosci* 10:1846-1855.
- Li W**, Neugebauer V (2004) Differential roles of mGluR1 and mGluR5 in brief and prolonged nociceptive processing in central amygdala neurons. *J Neurophysiol* 91:13-24.
- Light AR**, Trevino DL, Perl ER (1979) Morphological features of functionally defined neurons in the marginal zone and substantia gelatinosa of the spinal dorsal horn. *J Comp Neurol* 186:151-171.

- Light AR**, Perl ER (1979a) Reexamination of the dorsal root projection to the spinal dorsal horn including observations on the differential termination of coarse and fine fibers. *J Comp Neurol* 186:117-131.
- Light AR**, Perl ER (1979b) Spinal termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibers. *J Comp Neurol* 186:133-150.
- Lopez-Avila A**, Rodriguez-Manzo G, Coffeen U, del Angel R, Pellicer F (2004) Self-injury behaviour induced by intraplantar carrageenan infiltration: a model of tonic nociception. *Brain Res Brain Res Protoc* 13:37-44.
- Lucibello FC**, Slater EP, Jooss KU, Beato M, Muller R (1990) Mutual transrepression of Fos and the glucocorticoid receptor: involvement of a functional domain in Fos which is absent in FosB. *Embo J* 9:2827-2834.
- Luis-Delgado OE**, Barrot M, Rodeau JL, Schott G, Benbouzid M, Poisbeau P, Freund-Mercier MJ, Lasbennes F (2006) Calibrated forceps: a sensitive and reliable tool for pain and analgesia studies. *J Pain* 7: 32-39
- Luo ZD**, Cizkova D (2000) The role of nitric oxide in nociception. *Curr Rev Pain* 4:459-466.
- Ma QP**, Woolf CJ (1996) Progressive tactile hypersensitivity: an inflammation-induced incremental increase in the excitability of the spinal cord. *Pain* 67:97-106.
- Maihöfner C**, Tegeder I, Euchenhofer C, deWitt D, Brune K, Bang R, Neuhuber W, Geisslinger G (2000a) Localization and regulation of cyclo-oxygenase-1 and -2 and neuronal nitric oxide synthase in mouse spinal cord. *Neuroscience* 101:1093-1108.
- Maihöfner C**, Euchenhofer C, Tegeder I, Beck KF, Pfeilschifter J, Geisslinger G (2000b) Regulation and immunohistochemical localization of nitric oxide synthases and soluble guanylyl cyclase in mouse spinal cord following nociceptive stimulation. *Neurosci Lett* 290:71-75.
- Mao J**, Price DD, Mayer DJ (1994) Thermal hyperalgesia in association with the development of morphine tolerance in rats: roles of excitatory amino acid receptors and protein kinase C. *J Neurosci* 14:2301-2312.
- Mao J** (2002) Opioid-induced abnormal pain sensitivity: implications in clinical opioid therapy. *Pain* 100:213-217.
- Marletta MA** (1993) Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 268:12231-12234.
- Martinez V**, Wang L, Mayer E, Tache Y (1998) Proximal colon distention increases Fos expression in the lumbosacral spinal cord and activates sacral parasympathetic NADPH-positive neurons in rats. *J Comp Neurol* 390:311-321.
- Matarredona ER**, Murillo-Carretero M, Moreno-Lopez B, Estrada C (2005) Role of nitric oxide in subventricular zone neurogenesis. *Brain Res Brain Res Rev* 49:355-366.

- Mattei JF** (2002) Ouverture du colloque "Organization de la prise en charge de la douleur: Repères pour les décideurs" 8 octobre. Ministère de la Santé.
- Mayer DJ**, Wolfle TL, Akil H, Carder B, Liebeskind JC (1971) Analgesia from electrical stimulation in the brainstem of the rat. *Science* 174:1351-1354.
- Mayer DJ**, Liebeskind JC (1974) Pain reduction by focal electrical stimulation of the brain: an anatomical and behavioral analysis. *Brain Res* 68:73-93.
- McClung CA**, Nestler EJ (2003) Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and DeltaFosB. *Nat Neurosci* 6:1208-1215.
- McClung CA**, Ulerly PG, Perrotti LI, Zachariou V, Berton O, Nestler EJ (2004) DeltaFosB: a molecular switch for long-term adaptation in the brain. *Brain Res Mol Brain Res* 132:146-154.
- Meller ST**, Gebhart GF (1993) Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* 52:127-136.
- Meller ST**, Cummings CP, Traub RJ, Gebhart GF (1994a) The role of nitric oxide in the development and maintenance of the hyperalgesia produced by intraplantar injection of carrageenan in the rat. *Neuroscience* 60: 367-374
- Meller ST**, Dykstra C, Grzybycki D, Murphy S, Gebhart GF (1994b) The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. *Neuropharmacology* 33:1471-1478.
- Meller ST**, Gebhart GF (1997) Intraplantar zymosan as a reliable, quantifiable model of thermal and mechanical hyperalgesia in the rat. *Eur J of Pain* 1:43-52.
- Melzack R**, Wall PD (1965) Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150:971-979.
- Melzack R** (1999) From the gate to the neuromatrix. *Pain Suppl* 6:S121-126.
- Michel T**, Feron O (1997) Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* 100:2146-2152.
- Millan MJ** (1999) The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57:1-164.
- Millan MJ** (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66:355-474.
- Molander C**, Xu Q, Grant G (1984) The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbosacral cord. *J Comp Neurol* 230:133-141.
- Molander C**, Grant G (1985) Cutaneous projections from the rat hindlimb foot to the substantia gelatinosa of the spinal cord studied by transganglionic transport of WGA-HRP conjugate. *J Comp Neurol* 237:476-484.

- Molander C**, Grant G (1986) Laminar distribution and somatotopic organization of primary afferent fibers from hindlimb nerves in the dorsal horn. A study by transganglionic transport of horseradish peroxidase in the rat. *Neuroscience* 19:297-312.
- Molander C**, Grant, G. (1995) Spinal cord cytoarchitecture. In G. Paxinos(Ed), *The Nervous System*, Second Edition, Academic Press, SanDiego
- Moller KA**, Johansson B, Berge OG (1998) Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. *J Neurosci Methods* 84:41-47.
- Molony V**, Kent JE (1997) Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. *J Anim Sci* 75:266-272.
- Moncada S**, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109-142.
- Monconduit L**, Bourgeois L, Bernard JF, Le Bars D, Villanueva L (1999) Ventromedial thalamic neurons convey nociceptive signals from the whole body surface to the dorsolateral neocortex. *J Neurosci* 19:9063-9072.
- Moro V**, Badaut J, Springhetti V, Edvinsson L, Seylaz J, Lasbennes F (1995) Regional study of the co-localization of neuronal nitric oxide synthase with muscarinic receptors in the cerebral cortex. *Neuroscience* 69:797-805.
- Morris TA**, Jafari N, DeLorenzo RJ (2000) Chronic DeltaFosB expression and increased AP-1 transcription factor binding are associated with the long term plasticity changes in epilepsy. *Brain Res Mol Brain Res* 79:138-149.
- Morton DB**, Griffiths PH (1985) Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec* 116:431-436.
- Murphy S** (2000) Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. *Glia* 29:1-13.
- Nakabeppu Y**, Nathans D (1991) A naturally occurring truncated form of FosB that inhibits Fos/Jun transcriptional activity. *Cell* 64:751-759.
- Nakagawa H**, Ikota N, Ozawa T, Kotake Y (2001) Dose- and time-dependence of radiation-induced nitric oxide formation in mice as quantified with electron paramagnetic resonance. *Nitric Oxide* 5:47-52.
- Nakatsuka T**, Park JS, Kumamoto E, Tamaki T, Yoshimura M (1999) Plastic changes in sensory inputs to rat substantia gelatinosa neurons following peripheral inflammation. *Pain* 82:39-47.
- Nathan C** (2002) Points of control in inflammation. *Nature* 420:846-852.
- Nawwar AM**, Sherif MF, Barakat NG (1995) Instrumented forceps for measurement of nerve compression forces. *J Biomech Eng* 117:53-58.

- Nazli M**, Hismiogullari ES, Thippeswamy T, Morris R (2001) How central is nitric oxide (NO) to the activation of c-fos in spinal neurones following noxious peripheral stimulation in the rat? *Brain Res* 888:172-175.
- Nestler EJ**, Kelz MB, Chen J (1999) DeltaFosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity. *Brain Res* 835:10-17.
- Nestler EJ**, Barrot M, Self DW (2001) DeltaFosB: a sustained molecular switch for addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:11042-11046.
- Neugebauer V**, Li W (2002) Processing of nociceptive mechanical and thermal information in central amygdala neurons with knee-joint input. *J Neurophysiol* 87:103-112.
- Noguchi K**, Kowalski K, Traub R, Solodkin A, Iadarola MJ, Ruda MA (1991) Dynorphin expression and Fos-like immunoreactivity following inflammation induced hyperalgesia are colocalized in spinal cord neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 10:227-233.
- Omote K**, Hazama K, Kawamata T, Kawamata M, Nakayaka Y, Toriyabe M, Namiki A (2001) Peripheral nitric oxide in carrageenan-induced inflammation. *Brain Res* 912:171-175.
- Organisation Mondiale de la Santé** (2004) Soins Palliatifs: Gestion des symptômes et soins de fin de vie. OMS.
- Osborne MG**, Coderre TJ (1999) Effects of intrathecal administration of nitric oxide synthase inhibitors on carrageenan-induced thermal hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 126:1840-1846.
- Ossipov MH**, Bian D, Malan TP, Jr., Lai J, Porreca F (1999) Lack of involvement of capsaicin-sensitive primary afferents in nerve-ligation injury induced tactile allodynia in rats. *Pain* 79:127-133.
- Ossipov MH**, Lai J, Malan TP, Jr., Porreca F (2000) Spinal and supraspinal mechanisms of neuropathic pain. *Ann N Y Acad Sci* 909:12-24.
- Palmer RM**, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526.
- Park SK**, Grzybicki D, Lin HL, Murphy S (1994) Modulation of inducible nitric oxide synthase expression in astroglial cells. *Neuropharmacology* 33:1419-1423.
- Park CS**, Krishna G, Ahn MS, Kang JH, Chung WG, Kim DJ, Hwang HK, Lee JN, Paik SG, Cha YN (2000) Differential and constitutive expression of neuronal, inducible, and endothelial nitric oxide synthase mRNAs and proteins in pathologically normal human tissues. *Nitric Oxide* 4:459-471.
- Perrotti LI**, Hadeishi Y, Ulery PG, Barrot M, Monteggia L, Duman RS, Nestler EJ (2004) Induction of DeltaFosB in reward-related brain structures after chronic stress. *J Neurosci* 24:10594-10602.

- Perrotti LI**, Bolanos CA, Choi KH, Russo SJ, Edwards S, Ulery PG, Wallace DL, Self DW, Nestler EJ, Barrot M (2005) DeltaFosB accumulates in a GABAergic cell population in the posterior tail of the ventral tegmental area after psychostimulant treatment. *Eur J Neurosci* 21:2817-2824.
- Petersson P**, Waldenstrom A, Fahraeus C, Schouenborg J (2003) Spontaneous muscle twitches during sleep guide spinal self-organization. *Nature* 424:72-75.
- Petko M**, Antal M (2000) Propriospinal afferent and efferent connections of the lateral and medial areas of the dorsal horn (laminae I-IV) in the rat lumbar spinal cord. *J Comp Neurol* 422:312-325.
- Pich EM**, Pagliusi SR, Tessari M, Talabot-Ayer D, Hooft van Huijsduijnen R, Chiamulera C (1997) Common neural substrates for the addictive properties of nicotine and cocaine. *Science* 275:83-86.
- Pilyavskii AI**, Maisky VA, Kalezic I, Ljubisavljevic M, Kostyukov AI, Windhorst U, Johansson H (2001) c-fos Expression and NADPH-d reactivity in spinal neurons after fatiguing stimulation of hindlimb muscles in the rat. *Brain Res* 923:91-102.
- Pilz RB**, Suhasini M, Idriss S, Meinkoth JL, Boss GR (1995) Nitric oxide and cGMP analogs activate transcription from AP-1-responsive promoters in mammalian cells. *Faseb J* 9:552-558.
- Pitcher GM**, Ritchie J, Henry JL (1999) 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.
- Poisbeau P**, Patte-Mensah C, Keller AF, Barrot M, Breton JD, Luis-Delgado OE, Freund-Mercier MJ, Mensah-Nyagan AG, Schlichter R (2005) Inflammatory pain upregulates spinal inhibition via endogenous neurosteroid production. *J Neurosci* 25:11768-11776.
- Posadas I**, Bucci M, Roviezzo F, Rossi A, Parente L, Sautebin L, Cirino G (2004) Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br J Pharmacol* 142:331-338.
- Pouget A**, Snyder LH (2000) Computational approaches to sensorimotor transformations. *Nat Neurosci* 3 Suppl:1192-1198.
- Presley RW**, Menetrey D, Levine JD, Basbaum AI (1990) Systemic morphine suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord. *J Neurosci* 10: 323-35.
- Price DD** (2000) Psychological and neural mechanisms of the affective dimension of pain. *Science* 288:1769-1772.
- Ralston HJ**, 3rd, Light AR, Ralston DD, Perl ER (1984) Morphology and synaptic relationships of physiologically identified low-threshold dorsal root axons stained with intraxonal horseradish peroxidase in the cat and monkey. *J Neurophysiol* 51:777-792.

- Randall LO**, Selitto JJ (1957) A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 111:409-419.
- Randić M** (1996) Plasticity of excitatory synaptic transmission in the spinal cord dorsal horn. *Prog Brain Res* 113:463-506.
- Randich A**, Meller ST, Gebhart GF (1997) Responses of primary afferents and spinal dorsal horn neurons to thermal and mechanical stimuli before and during zymosan-induced inflammation of the rat hindpaw. *Brain Res* 772:135-148.
- Redemann-Fibi B**, Schuermann M, Muller R (1991) Stage and tissue-specific expression of fosB during mouse development. *Differentiation* 46:43-49.
- Ren K** (1999) An improved method for assessing mechanical allodynia in the rat. *Physiol Behav* 67:711-716.
- Renfrey S**, Downton C, Featherstone J (2003) The painful reality. *Nat Rev Drug Discov* 2:175-176.
- Rengasamy A**, Johns RA (1993) Regulation of nitric oxide synthase by nitric oxide. *Mol Pharmacol* 44:124-128.
- Reuss MH**, Reuss S (2001) Nitric oxide synthase neurons in the rodent spinal cord: distribution, relation to Substance P fibers, and effects of dorsal rhizotomy. *J Chem Neuroanat* 21:181-196.
- Ross R**, Reske-Kunz AB (2001) The role of NO in contact hypersensitivity. *Int Immunopharmacol* 1:1469-1478.
- Rousselet MC**, Vignaud, JM, Hofman P, Chatelet FP (2005) Inflammation et pathologie inflammatoire) AFECAP.:1-57.
- Rygh LJ**, Svendsen F, Hole K, Tjolsen A (2001) Increased spinal N-methyl-D-aspartate receptor function after 20 h of carrageenan-induced inflammation. *Pain* 93:15-21.
- Sabatowski R**, Schafer D, Kasper SM, Brunsch H, Radbruch L (2004) Pain treatment: a historical overview. *Curr Pharm Des* 10:701-716.
- Saito S**, Kidd GJ, Trapp BD, Dawson TM, Bredt DS, Wilson DA, Traystman RJ, Snyder SH, Hanley DF (1994) Rat spinal cord neurons contain nitric oxide synthase. *Neuroscience* 59:447-456.
- Sakurada C**, Sugiyama A, Nakayama M, Yonezawa A, Sakurada S, Tan-No K, Kisara K, Sakurada T (2001) Antinociceptive effect of spinally injected L-NAME on the acute nociceptive response induced by low concentrations of formalin. *Neurochem Int* 38:417-423.
- Salvemini D**, Wang ZQ, Wyatt PS, Bourdon DM, Marino MH, Manning PT, Currie MG (1996) Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br J Pharmacol* 118:829-838.

- Sandkühler J**, Treier AC, Liu XG, Ohnimus M (1996) The massive expression of c-fos protein in spinal dorsal horn neurons is not followed by long-term changes in spinal nociception. *Neuroscience* 73:657-666.
- Schaible HG**, Neugebauer V, Cervero F, Schmidt RF (1991) Changes in tonic descending inhibition of spinal neurons with articular input during the development of acute arthritis in the cat. *J Neurophysiol* 66:1021-1032.
- Scharmann W** (1999) Physiological and ethological aspects of the assessment of pain, distress and suffering humane endpoints in animal experiments for biomedical research. 33-39.
- Schouenborg J**, Kalliomaki J (1990) Functional organization of the nociceptive withdrawal reflexes. I. Activation of hindlimb muscles in the rat. *Exp Brain Res* 83:67-78.
- Schouenborg J**, Weng HR (1994) Sensorimotor transformation in a spinal motor system. *Exp Brain Res* 100:170-174.
- Schouenborg J**, Weng HR, Kalliomaki J, Holmberg H (1995) A survey of spinal dorsal horn neurones encoding the spatial organization of withdrawal reflexes in the rat. *Exp Brain Res* 106:19-27.
- Schouenborg J** (2002) Modular organisation and spinal somatosensory imprinting. *Brain Res Brain Res Rev* 40:80-91.
- Sennequier N**, Vadon-Le Goff S (1998) Biosynthèse du monoxyde d'azote (NO): mécanisme, régulation et contrôle. *Médecine Sciences* 14:1185-1195.
- Sewards TV**, Sewards M (2002a) Separate, parallel sensory and hedonic pathways in the mammalian somatosensory system. *Brain Res Bull* 58:243-260.
- Sewards TV**, Sewards MA (2002b) The medial pain system: neural representations of the motivational aspect of pain. *Brain Res Bull* 59:163-180.
- Sheng M**, Greenberg ME (1990) The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4:477-485.
- Shortland P**, Woolf CJ (1993) Morphology and somatotopy of the central arborizations of rapidly adapting glabrous skin afferents in the rat lumbar spinal cord. *J Comp Neurol* 329:491-511.
- Skyba DA**, Radhakrishnan R, Sluka KA (2005) Characterization of a method for measuring primary hyperalgesia of deep somatic tissue. *J Pain* 6:41-47.
- Solano R**, Herrero JF (1999) Response properties of hind limb single motor units in normal rats and after carrageenan-induced inflammation. *Neuroscience* 90:1393-1402.
- Soma LR** (1987) Assessment of animal pain in experimental animals. *Lab Anim Sci* 37 Spec No:71-74.

**South SM**, Kohno T, Kaspar BK, Hegarty D, Vissel B, Drake CT, Ohata M, Jenab S, Sailer AW, Malkmus S, Masuyama T, Horner P, Bogulavsky J, Gage FH, Yaksh TL, Woolf CJ, Heinemann SF, Inturrisi CE (2003) A conditional deletion of the NR1 subunit of the NMDA receptor in adult spinal cord dorsal horn reduces NMDA currents and injury-induced pain. *J Neurosci* 23:5031-5040.

**Stanfa LC**, Dickenson AH (1999) The role of non-N-methyl-D-aspartate ionotropic glutamate receptors in the spinal transmission of nociception in normal animals and animals with carrageenan inflammation. *Neuroscience* 93:1391-1398.

**Stefano GB**, Ottaviani E (2002) The biochemical substrate of nitric oxide signaling is present in primitive non-cognitive organisms. *Brain Res* 924:82-89.

**Stewart VC**, Heslegrave AJ, Brown GC, Clark JB, Heales SJ (2002) Nitric oxide-dependent damage to neuronal mitochondria involves the NMDA receptor. *Eur J Neurosci* 15:458-464.

**Sung CS**, Wen ZH, Chang WK, Ho ST, Tsai SK, Chang YC, Wong CS (2004) Intrathecal interleukin-1beta administration induces thermal hyperalgesia by activating inducible nitric oxide synthase expression in the rat spinal cord. *Brain Res* 1015:145-153.

**Suzuki T**, Kishimoto Y, Misawa M (1996) Formalin- and carrageenan-induced inflammation attenuates place preferences produced by morphine, methamphetamine and cocaine. *Life Sci* 59:1667-1674.

**Swett JE**, Woolf CJ (1985) The somatotopic organization of primary afferent terminals in the superficial laminae of the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 231:66-77.

**Swiss Academy of Medical Sciences and Swiss Academy of Sciences** (1997) Ethical principles and guidelines for scientific experiments on animals. *Alternatives to laboratory animals*. 25:379-384.

**Szabo C** (1996) Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system. *Brain Res Bull* 41:131-141.

**Taiwo YO**, Coderre TJ, Levine JD (1989) The contribution of training to sensitivity in the nociceptive paw-withdrawal test. *Brain Res* 487:148-151.

**Takahashi Y**, Nakajima Y (1996) Dermatomes in the rat limbs as determined by antidromic stimulation of sensory C-fibers in spinal nerves. *Pain* 67:197-202.

**Takahashi Y**, Hirayama J, Nakajima Y (2002) Segmental regulation pattern of body surface temperature in the rat hindlimb. *Brain Res* 947:100-109.

**Takahashi Y**, Chiba T, Kurokawa M, Aoki Y (2003) Dermatomes and the central organization of dermatomes and body surface regions in the spinal cord dorsal horn in rats. *J Comp Neurol* 462:29-41.

- Talavera-Cuevas E**, Espinoza-Olalde A, Condés-Lara M. Intraplantar carrageenan is associated with increase in constitutive nitric oxide synthase catalytic activity in amygdala. (2003). 33<sup>rd</sup> Annual Meeting. Society for Neuroscience, New Orleans, session No. 695, theme c. Abstract 695.16.
- Tang FR**, Tan CK, Ling EA (1995) Light and electron microscopic studies of the distribution of NADPH-diaphorase in the rat upper thoracic spinal cord with special reference to the spinal autonomic region. *Arch Histol Cytol* 58:493-505.
- Tao F**, Tao YX, Mao P, Zhao C, Li D, Liaw WJ, Raja SN, Johns RA (2003) Intact carrageenan-induced thermal hyperalgesia in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Neuroscience* 120:847-854.
- Tao F**, Tao YX, Zhao C, Dore S, Liaw WJ, Raja SN, Johns RA (2004) Differential roles of neuronal and endothelial nitric oxide synthases during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia. *Neuroscience* 128:421-430.
- Tedesco LS**, Fuseler J, Grisham M, Wolf R, Roerig SC (2002) Therapeutic administration of nitric oxide synthase inhibitors reverses hyperalgesia but not inflammation in a rat model of polyarthritis. *Pain* 95:215-223.
- Tolle TR**, Castro-Lopes JM, Coimbra A, Zieglgansberger W (1990) Opiates modify induction of c-fos proto-oncogene in the spinal cord of the rat following noxious stimulation. *Neurosci Lett* 111: 46-51.
- Traub RJ**, Solodkin A, Meller ST, Gebhart GF (1994) Spinal cord NADPH-diaphorase histochemical staining but not nitric oxide synthase immunoreactivity increases following carrageenan-produced hindpaw inflammation in the rat. *Brain Res* 668:204-210.
- Trush MA**, Egner PA, Kensler TW (1994) Myeloperoxidase as a biomarker of skin irritation and inflammation. *Food Chem Toxicol* 32:143-147.
- Tuor UI**, Kurpita G, Simone C (1994) Correlation of local changes in cerebral blood flow, capillary density, and cytochrome oxidase during development. *J Comp Neurol* 342:439-448.
- Van Beveren C**, van Straaten F, Curran T, Muller R, Verma IM (1983) Analysis of FBJ-MuSV provirus and c-fos (mouse) gene reveals that viral and cellular fos gene products have different carboxy termini. *Cell* 32: 1241-55.
- Valtschanoff JG**, Weinberg RJ, Rustioni A (1992a) NADPH diaphorase in the spinal cord of rats. *J. Comp. Neurol.* 321: 209-222.
- Valtschanoff JG**, Weinberg RJ, Rustioni A, Schmidt HH (1992b) Nitric oxide synthase and GABA colocalize in lamina II of rat spinal cord. *Neurosci Lett* 148: 6-10
- Vetter G**, Geisslinger G, Tegeder I (2001) Release of glutamate, nitric oxide and prostaglandin E2 and metabolic activity in the spinal cord of rats following peripheral nociceptive stimulation. *Pain* 92:213-218.

- Villanueva L**, Nathan PW (2000) "Multiple Pain Pathways". *Proceeding of the 9<sup>th</sup> World Congress on pain*. Progress in Pain Research and Management. Vol. 16, edited by M Devor, MC Rowbotham and Z Wiesenfeld-Hallin. IASP Press. Seattle.
- Villanueva L** (2001) Les voies de la douleur: une multiplicité à l'égale de l'expérience douloureuse. *La Lettre*. Institut UPSA de la douleur 14: 1-9.
- Vinegar R**, Truax JF, Selph JL, Johnston PR, Venable AL, McKenzie KK (1987) Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. *Fed Proc* 46:118-126.
- Voitenko N**, Gerber G, Youn D, Randic M (2004) Peripheral inflammation-induced increase of AMPA-mediated currents and Ca<sup>2+</sup> transients in the presence of cyclothiazide in the rat substantia gelatinosa neurons. *Cell Calcium* 35:461-469.
- Vogt BA**, Sikes RW (2000) The medial pain system, cingulate cortex, and parallel processing of nociceptive information. *Prog Brain Res* 122:223-235.
- Wang CH**, Chou WY, Hung KS, Jawan B, Lu CN, Liu JK, Hung YP, Lee TH (2005) Intrathecal administration of roscovitine inhibits Cdk5 activity and attenuates formalin-induced nociceptive response in rats. *Acta Pharmacol Sin* 26:46-50.
- Watkins LR**, Milligan ED, Maier SF (2001) Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci* 24:450-455.
- Wei F**, Dubner R, Ren K (1999) Nucleus reticularis gigantocellularis and nucleus raphe magnus in the brain stem exert opposite effects on behavioral hyperalgesia and spinal Fos protein expression after peripheral inflammation. *Pain* 80:127-141.
- Werme M**, Messer C, Olson L, Gilden L, Thoren P, Nestler EJ, Brene S (2002) Delta FosB regulates wheel running. *J Neurosci* 22:8133-8138.
- WHO** (2001) International Classification of Functioning, Disability and Health (ICF)). World Health Organization.
- WHO** (2004) International Classification of Diseases (ICD-10)). World Health Organization update.
- Willis WD**, Coggeshall RE. (1991) *Sensory mechanisms of the spinal cord*, 2nd ed. New York: Plenum Press.
- Willis WD**, Westlund KN (1997) Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J Clin Neurophysiol* 14:2-31.
- Willis WD**, Al-Chaer ED, Quast MJ, Westlund KN (1999) A visceral pain pathway in the dorsal column of the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7675-7679.
- Winter CA**, Risley EA, Nuss GW (1962) Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* 111:544-547.

- Wolf CJ** (1987) Central terminations of cutaneous mechanoreceptive afferents in the rat lumbar spinal cord. *J Comp Neurol* 261:105-119.
- Wolf CJ, Doubell TP** (1994) The pathophysiology of chronic pain--increased sensitivity to low threshold A beta-fibre inputs. *Curr Opin Neurobiol* 4:525-534.
- Wolf CJ, Costigan M** (1999) Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 7723-30.
- Wolf CJ, Mannion RJ** (1999) Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 353:1959-1964.
- Wolf CJ, Salter MW** (2000) Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288:1765-1769.
- Woolfe G, MacDonald AL** (1944) The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). *J Pharmacol Exp Ther* 80: 300-307.
- Wu J, Fang L, Lin Q, Willis WD** (2000) Fos expression is induced by increased nitric oxide release in rat spinal cord dorsal horn. *Neuroscience* 96:351-357.
- Wu J, Fang L, Lin Q, Willis WD** (2001) Nitric oxide synthase in spinal cord central sensitization following intradermal injection of capsaicin. *Pain* 94:47-58.
- Xu XJ, Elfvin A, Wiesenfeld-Hallin Z** (1995) Subcutaneous carrageenan, but not formalin, increases the excitability of the nociceptive flexor reflex in the rat. *Neurosci Lett* 196:116-118.
- Yen J, Wisdom RM, Tratner I, Verma IM** (1991) An alternative spliced form of FosB is a negative regulator of transcriptional activation and transformation by Fos proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:5077-5081.
- Yu YC, Koo ST, Kim CH, Lyu Y, Grady JJ, Chung JM** (2002) Two variables that can be used as pain indices in experimental animal models of arthritis. *J Neurosci Methods* 115:107-113.
- Zerial M, Toschi L, Ryseck RP, Schuermann M, Muller R, Bravo R** (1989) The product of a novel growth factor activated gene, fos B, interacts with JUN proteins enhancing their DNA binding activity. *Embo J* 8:805-813.
- Zhang X, Verge V, Wiesenfeld-Hallin Z, Ju G, Brecht D, Synder SH, Hokfelt T** (1993) Nitric oxide synthase-like immunoreactivity in lumbar dorsal root ganglia and spinal cord of rat and monkey and effect of peripheral axotomy. *J Comp Neurol* 335:563-575.
- Zharkovsky A, Katajamaki J, Seppala T, Ahtee L** (1999) Morphine-induced analgesia in rats withdrawn from concurrent nimodipine and morphine treatment. *Pain* 79:217-222.

**Zhou QQ**, Imbe H, Zou S, Dubner R, Ren K (2001) Selective upregulation of the flip-flop splice variants of AMPA receptor subunits in the rat spinal cord after hindpaw inflammation. *Brain Res Mol Brain Res* 88:186-193.

**Ziche M**, Morbidelli L (2000) Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol* 50:139-148.

**Zieglansberger W**, Tolle TR (1993) The pharmacology of pain signalling. *Curr Opin Neurobiol* 3:611-618.

**Zimmermann M** (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109-110.

**Zochodne DW**, Sun H, Li XQ (2001) Evidence that nitric oxide- and opioid-containing interneurons innervate vessels in the dorsal horn of the spinal cord of rats. *J Physiol* 532:749-758.

## OUVRAGES

**Bonica JJ** (1990) *The Management of pain*. 2<sup>nd</sup> ed. Vol.1, Philadelphia. Lea & Febiger.

**Paxinos G**, Watson Ch (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Fourth edition. Australia. Academic Press.

**Rey R** (2000) *Histoire de la douleur*. Paris. La Découverte, poche; 84.

**Vibert JF**, Sébille A, Lavallard-Rousseau MC, Boureau F (2005) *Neurophysiologie: De la physiologie à l'exploration fonctionnelle*. Paris. Elsevier.

## SITES INTERNET

Association Française des Enseignants en Cytologie et Anatomie Pathologiques (AFECAP):

<http://medidacte.timone.univ-mrs.fr/webcours/umvf/anapath/corpus.htm>

ANAES: [www.anaes.fr](http://www.anaes.fr)

EFIC: [www.efic.org](http://www.efic.org)

IASP: [www.iasp-pain.org](http://www.iasp-pain.org)

Ministère de la Santé: [www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/](http://www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/)

UPSA: [www.institut-upsa-douleur.org](http://www.institut-upsa-douleur.org)

SFETD: [www.setd-douleur.org](http://www.setd-douleur.org)

TNS Sofres: [www.tns-sofres.com](http://www.tns-sofres.com)

WHO: [www.who.int/classifications/en/](http://www.who.int/classifications/en/)

[www.library.ucla.edu/.../painexhibit/panel6.htm](http://www.library.ucla.edu/.../painexhibit/panel6.htm)

## VIII. Communications

*Il est bon d'apprendre à être sage à l'école de la douleur*

*Eschyle*

*Les Euménides*

**Communications affichés:**

6<sup>E</sup> COLLOQUE DE LA SOCIETE DES NEUROSCIENCES

Rouen, 13-16 mai 2003

**Luis Delgado O E.** (1), Patte-Mensah C. (1), Condés-Lara M. (2) & Lasbennes F. (1)  
(1) UMR7519, CNRS/ULP Strasbourg; France ; (2) Inst, Neurobiol. UNAM., Qro. México  
Etude immunofluorescente de l'enzyme neuronale de synthèse de NO (nNOS) dans la moelle épinière de rat lors d'une stimulation nociceptive inflammatoire.

4TH FORUM OF EUROPEAN NEUROSCIENCE

Lisbon, juillet 10-14 2004

**Luis Delgado O E.**, Barrot M., Freund-Mercier MJ. & Lasbennes F  
UMR7519, CNRS/ULP, Strasbourg, France  
Spinal cord FosB-like immunostaining in a carrageenan model of inflammatory pain.

7<sup>E</sup> COLLOQUE DE LA SOCIETE DES NEUROSCIENCES

Lille, 17-20 mai 2005

**Luis Delgado O E.**, Schott G., Barrot M., Freund-Mercier MJ., Lasbennes F. & Poisbeau P  
UMR7519, CNRS/ULP, Strasbourg, France  
Time-course of pain threshold and analgesic effect of morphine using a calibrated forceps in a model of inflammatory pain.

Benbouzid M., Veinante P., **Luis Delgado O.**, Waltisperger E., Freund-Mercier MJ. & Barrot M. UMR7519, CNRS/ULP, Strasbourg, France  
Mapping of cerebral FosB expression in the rat brain after intraplantar injection of carrageenan.

**Publications:**

Poisbeau P, Patte-Mensah C, Keller AF, Barrot M, Breton JD, **Luis-Delgado OE**, Freund-Mercier MJ, Mensah-Nyagan AG, Schlichter R (2005) Inflammatory pain upregulates spinal inhibition via endogenous neurosteroid production. *J Neurosci* 25:11768-11776.

**Luis-Delgado OE**, Barrot M, Rodeau JL, Schott G, Benbouzid M, Poisbeau P, Freund-Mercier MJ, Lasbennes F (2006) Calibrated forceps: a sensitive and reliable tool for pain and analgesia studies. *J Pain* 7: 32-39

**Luis-Delgado OE**, Barrot M, Rodeau JL, Freund-Mercier MJ, Lasbennes F. The transcription factor  $\Delta$ FosB is recruited by inflammatory pain. *J Neurochem* (in press).