

THESE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Spécialité : Neurosciences



Présentée et soutenue publiquement le 14 septembre 2011

par :

Yohann BOHREN

Mécanisme d'action d'un antidépresseur tricyclique dans un modèle murin de douleur neuropathique

Membres du Jury :

**Pr. André MULLER
Pr. Juan Antonio MICO
Dr. Michel POHL
Dr. Luc-Henri TESSIER
Dr. Michel BARROT**

**Rapporteur interne
Rapporteur externe
Rapporteur externe
Membre invité
Directeur de thèse**

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaite remercier sincèrement les membres du jury de thèse :
Messieurs Juan Antonio Mico et Michel Pohl qui ont aimablement accepté d'être les rapporteurs de ce mémoire de thèse,
Monsieur André Muller qui a accepté d'examiner ce travail,
Je tiens également à remercier Monsieur Michel Barrot pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir fait confiance. Je lui en suis très reconnaissant.

Un grand merci à Madame Freund-Mercier Marie-José pour avoir consacré de son temps à la lecture et à la correction de cette thèse.

Je remercie très chaleureusement Monsieur Luc-Henri Tessier pour m'avoir encadré et transmis une partie de son savoir-faire en biologie moléculaire. Tout ce travail n'aurait pu se réaliser sans lui.

Je remercie également Madame Ipek Yalcin, qui est en plus d'être une amie, s'est révélée une collaboratrice de choix et une chirurgienne hors pair ! En effet, sans elle, la majorité de ce travail n'aurait pu avoir lieu.

Je voudrais tout particulièrement remercier Messieurs Petitjean, Hugel et Schlichter du troisième étage, pour leur aide fournie au cours des expériences de single cell PCR et d'imagerie calcium.

Je voudrais vraiment remercier tous les membres du laboratoire sans ordre particulier pour leur aide et leur sympathie.

Un grand merci à Betty pour sa gentillesse, son aide apportée au cours de ce travail de thèse, et surtout sa bonne humeur même si je sais que je n'ai pas toujours été tendre avec elle ...

Je voudrais aussi remercier Dorothee Daniel, pour les quelques mois passés au laboratoire à m'aider, mais surtout à faire les immunos de ce travail de thèse.

Je tenais également à remercier Mademoiselle Pawlowski Sophie pour m'avoir formé à l'illustration scientifique. Merci aussi de m'avoir supporté trois années dans notre bureau commun.

Un merci s'adresse également à notre médecin de service, Monsieur Eric Salvat, pour son aide apportée dans la compréhension du vocabulaire médical !

Je voudrais sincèrement remercier Romain, Florent, Hugues, Maya, Sophie et Salim pour leur bonne humeur et pour les bons moments passés ensemble, notamment au RU...

Enfin, pour finir, je tenais tout particulièrement à remercier mes parents, ma famille et ma compagne pour leur soutien inconditionnel depuis le début.

Liste des abréviations	
Publications et communications	
AVANT-PROPOS	p. 01
INTRODUCTION	p. 02
A. De la douleur en général	p. 02
I. Histoire de la douleur et de sa prise en charge	p. 02
II. Qu'est-ce que la douleur ?	p. 03
1. Définition	p. 03
2. Douleur aiguë et douleur chronique	p. 04
III. Douleur neuropathique	p. 05
1. Définition	p. 05
2. Etiologie centrale ou périphérique	p. 06
3. Sémiologie	p. 07
a. Symptomatologie nociceptive	p. 07
b. Symptomatologie affective	p. 08
4. Prise en charge thérapeutique	p. 08
a. Traitement pharmacologique	p. 08
b. Traitement non pharmacologique	p. 10
B. Physiopathologie de la douleur neuropathique	p. 12
I. De la physiopathologie clinique à la modélisation animale	p. 12
II. Modifications périphériques	p. 14
1. Implication de cellules non neuronales	p. 14
2. Implication de canaux ioniques	p. 15
3. Système nerveux sympathique	p. 18
4. Système opioïdergique périphérique	p. 20
III. Modifications centrales	p. 23
1. Augmentation de la neurotransmission excitatrice spinale	p. 23
2. Diminution de la neurotransmission inhibitrice spinale	p. 24
a. Perte de l'inhibition GABAergique	p. 24
b. Système opioïdergique central	p. 25
c. Contrôles inhibiteurs descendants aminergiques	p. 26
3. Changements impliquant certaines structures supraspinales	p. 27
4. Interaction neuro-immuno-gliale	p. 29
C. Implication des cytokines dans la douleur neuropathique	p. 30
D. Douleur neuropathique et antidépresseurs	p. 65
I. Traitements de la douleur neuropathique par les antidépresseurs : informations cliniques	p. 65
1. Action antalgique propre	p. 65
2. Efficacité des antidépresseurs	p. 66

II. Traitements de la douleur neuropathique par les antidépresseurs : informations précliniques	p. 68
1. Traitement par les antidépresseurs : aigu <i>versus</i> prolongé	p. 68
2. Traitement par les antidépresseurs : effet périphérique et/ou central	p. 70
3. Traitement par les antidépresseurs : mécanisme d'action	p. 72
a. Hypothèse monoaminergique	p. 72
b. Hypothèse opioïdergique	p. 73
c. Hypothèse neuro-immune	p. 74
d. Autres hypothèses	p. 75
4. Traitement par les antidépresseurs : rôle particulier des récepteurs β_2 -adrénergiques	p. 76
E. Objectifs du doctorat	p. 79
 RESULTATS	 p. 81
A. Mécanisme d'action des antidépresseurs tricycliques et des β_2-mimétiques contre l'allodynie neuropathique	p. 81
B. Rôle du système opioïdergique dans l'effet thérapeutique des antidépresseurs tricycliques et des β_2-mimétiques	p. 102
I. Rôle des récepteurs opioïdes <i>Mu</i> dans l'effet thérapeutique des antidépresseurs tricycliques	p. 102
II. Rôle des récepteurs opioïdes <i>Kappa</i> dans l'effet thérapeutique des antidépresseurs tricycliques	p. 103
1. Introduction	p. 103
2. Matériel et méthode	p. 103
3. Résultats	p. 104
4. Discussion	p. 105
III. Rôle du système opioïdergique dans l'effet thérapeutique des β_2-mimétiques	p. 108
1. Introduction	p. 108
2. Matériel et méthode	p. 108
3. Résultats	p. 108
4. Discussion	p. 109
IV. Localisation de l'effet opioïdergique des antidépresseurs tricycliques et des β_2-mimétiques	p. 110
1. Introduction	p. 110
2. Matériel et méthode	p. 111
3. Résultats	p. 111
4. Discussion	p. 112
 DISCUSSION GENERALE	 p. 113
A. Hypothèses physiopathologiques de la douleur neuropathique	p. 114

I. Douleur neuropathique et neuroinflammation	p. 114
II. Douleur neuropathique et canaux ioniques	p. 116
III. Douleur neuropathique et système nerveux sympathique	p. 118
B. Le ganglion rachidien : lieu d'action des antidépresseurs.....	p. 121
I. Site d'action en fonction du traitement par les antidépresseurs	p. 121
II. Antidépresseur et VIH	p. 123
III. Antidépresseur et lésion médullaire	p. 125
C. Lien entre les récepteurs β_2-adrénergiques, δ-opioïdes et le TNF-α	p. 127
I. Lien entre les récepteurs β_2 -adrénergiques et δ -opioïdes	p. 127
II. Lien entre les récepteurs β_2 -adrénergiques et le TNF- α	p. 128
III. Lien entre les récepteurs δ -opioïdes et le TNF- α	p. 129
D. Concept de balance inter- et intracellulaire	p. 130
E. Délai thérapeutique	p. 132
 PERSPECTIVES	 p. 135
 ANNEXES	 p. 136
 REFERENCES	 p. 137

LISTE DES ABREVIATIONS

AAE	acide amine excitateur
AMM	autorisation de mise sur le marché
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate
ARNm	ARN messenger
ATC	antidépresseur tricyclique
ATP	adenosine triphosphate
CCI	constriction chronique du nerf sciatique
CGRP	calcitonin gene-related peptide
COMT	catechol-O-méthyl transférase
DOR	récepteur des opioïdes de type delta
D β H	dopamine β -hydroxylase
GABA	acide γ -aminobutyrique
IASP	association internationale pour l'étude de la douleur
IL	interleukin
IRN	inhibiteur de la recapture de la noradrénaline
IRS	inhibiteur de la recapture de la sérotonine
IRSN	inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline
KCC2	co-transporteur potassium/chlore
KO	knock-out
KOR	récepteur des opioïdes de type kappa
MAO	monoamine oxydase
mGluR2	récepteur métabotrope du glutamate de type 2
MOR	récepteur des opioïdes de type mu
NET	transporteur de la noradrénaline
NGF	nerve growth factor
NK1	neurokinine
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
PCR	réaction en chaîne par polymérase
PKA	protéine kinase A
PSL	ligature partielle du nerf sciatique
RVM	bulbe rostro-ventral
SDRC	syndrome douloureux régional complexe

SERT	transporteur de la sérotonine
SIP	douleur indépendante du système nerveux sympathique
SMP	douleur dépendante du système nerveux sympathique
SNL	ligature des nerfs spinaux
TNF- α	facteur nécrosant de tumeur α
TTX	tétradotoxine
VIH	virus de l'immunodéficience humaine

PUBLICATIONS DE THESE:

Bohren Y, Karavelic D, Tessier LH, Yalcin I, Gavériaux-Ruff C, Kieffer BL, Freund- Mercier MJ, Barrot M.

*Mu-opioid receptors are not necessary for nortriptyline treatment of neuropathic allodynia. **European Journal of Pain**, 2010, 14(7): 700-4.*

Bohren Y, Yalcin I, Freund Mercier MJ, Tessier LH, Barrot M.

Cytokines in neuropathic pain. Revue.

British journal of pharmacology, 2011, Soumis.

Bohren Y, Yalcin I, Petitjean H, Daniel D, Hugel S, Hein L, Schlichter R, Freund Mercier MJ, Tessier LH, Barrot M.

Antidepressant drug relieves neuropathic pain by a peripheral β_2 -adrenoceptor mediated anti-TNF- α mechanism in mouse model. (en écriture)

Bohren Y, Yalcin I, Freund Mercier MJ, Tessier LH, Barrot M.

Kappa-opioid receptors are not critical for nortriptyline treatment of neuropathic pain. (à écrire)

Bohren Y, Yalcin I, Freund Mercier MJ, Tessier LH, Barrot M.

Only δ -opioid receptors are necessary for the antiallodynic action of antidepressant drugs and of β_2 -mimetics in neuropathic pain. (à écrire)

PUBLICATION DE THESE ISSUE D'UNE COLLABORATION:

Yalcin I, **Bohren Y**, Waltisperger E, Ciocca D, Yin JC, Freund Mercier MJ, Barrot M.

A time-dependent history of mood disorders in a murine model of neuropathic pain.

Biological Psychiatry, 2011.

PUBLICATION ISSUE DU MASTER:

Aliane V, Pérez S, **Bohren Y**, Deniau JM, Kemel ML.

Key role of striatal cholinergic interneurons in processes leading to arrest of motor stereotypies.

Brain, 2011, 134(Pt 1):110-8

COMMUNICATIONS AFFICHEES:

Bohren Y, Yalcin I, Tessier LH, Hein L, Gavériaux-Ruff C, Kieffer B, Freund-Mercier MJ, Barrot M.

δ - but not μ - or κ -opioid receptors are essential for the antiallodynic action of antidepressant drugs and of β 2-mimetics in neuropathic pain.

Congrès annuel du réseau européen Neurex , juin 2009, Strasbourg (France).

Bohren Y, Yalcin I, Tessier LH, Benbouzid M, Waltisperger E, Gavériaux-Ruff C, Kieffer B, Hein L, Freund-Mercier MJ, Barrot M.

Action mechanism of a tricyclic antidepressant drug in a murine model of neuropathic pain.

Congrès annuel du réseau européen Neurex , juin 2010, Bâle (Suisse).

Bohren Y, Yalcin I, Tessier LH, Gavériaux-Ruff C, Kieffer B, Hein L, Freund-Mercier MJ, Barrot M.

Only δ -opioid receptors are necessary for the antiallodynic action of antidepressant drugs and of β 2-mimetics in neuropathic pain.

13^{ème} Congrès de l'association internationale pour l'étude de la douleur (IASP), août 2010, Montréal (Canada). Bourse de l'IASP.

CONFERENCES:

Bohren Y, Yalcin I, Freund-Mercier MJ, Hein L, Tessier LH, Barrot M.

Mécanisme d'action d'un antidépresseur tricyclique dans le traitement de la douleur neuropathique.

7^{ème} Symposium National du Réseau de Recherche sur la Douleur, janvier 2011, Versailles (France).

AVANT PROPOS

La douleur neuropathique résulte d'une lésion ou d'une maladie du système somatosensoriel. Elle apparaît comme une condition chronique, débilitante pour le patient et qui répond mal aux traitements antalgiques classiques. Les recommandations cliniques mentionnent les antidépresseurs, plus particulièrement les antidépresseurs tricycliques ou les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, comme première ligne de traitement dans la prise en charge de la douleur neuropathique. Cependant le mécanisme précis par lequel ces antidépresseurs soulagent la douleur neuropathique reste peu connu.

Les études cliniques s'accordent à dire que les antidépresseurs n'ont pas d'action antalgique *per se*. En d'autres termes, ils ne soulagent pas la douleur neuropathique de façon immédiate, suggérant ainsi que le délai thérapeutique nécessaire à leur action thérapeutique correspondrait au recrutement d'effecteurs secondaires.

Dans une introduction bibliographique, nous reviendrons dans une première partie sur la définition et les caractéristiques cliniques des douleurs neuropathiques, puis sur l'aspect physiopathologique avec notamment un chapitre dédié au rôle particulier du système des cytokines et enfin une partie sur les connaissances du mécanisme d'action des antidépresseurs dans la douleur neuropathique. Deux chapitres de résultats seront présentés à la suite de cette introduction. Le premier abordera la localisation et le mécanisme moléculaire de l'action thérapeutique des antidépresseurs tricycliques et des β_2 -mimétiques contre la douleur neuropathique. Le second traitera de l'implication du système opioïdergique dans l'effet thérapeutique des antidépresseurs ou des β_2 -mimétiques. Enfin, une discussion générale viendra critiquer et discuter nos résultats.

INTRODUCTION

A. De la douleur en général

I. Histoire de la douleur et de sa prise en charge

« Compagne de l'Homme depuis l'origine, la douleur traverse l'histoire de la médecine comme sa bande-son bruyante » (Dr Fabrice Lorin). Au fil des époques et des cultures, elle a suscité des considérations socio-culturelles et médicales contrastées. Il n'est donc pas de civilisation ou de société qui n'ait essayé de donner un sens à la douleur.

Il y a plusieurs milliers d'années, en dépit de nombreux phénomènes de croyances associés à la douleur, l'Homme s'est doté de « remèdes » globalement efficaces contre les douleurs les plus violentes, comme en témoigne le papyrus d'Ebers émis 1550 ans avant notre ère où des compositions à base d'opium sont déjà recommandées. Durant l'Antiquité, Hippocrate de Cos dégage la médecine des légendes et des croyances. Il conçoit la douleur comme un symptôme naturel, un signe pour le diagnostic mais dont le traitement antalgique est à proscrire. Avec les médecines grecque et arabe, les premières définitions relatives à la douleur ou à sa sémiologie apparaissent. Mais, au Moyen-âge, sous la pression de l'Eglise catholique qui interdit toute forme de recherche scientifique, on assiste à un retour de la douleur « châtiment ou épreuve de Dieu », ainsi la douleur se veut punitive et rédemptrice. Il faut attendre la Réforme protestante pour que la médecine grecque sous influence hippocratique soit remise au goût du jour. La douleur est de nouveau considérée comme un signe important pour le diagnostic, mais cette fois-ci le médecin a volonté d'apaiser la douleur ressentie par le patient. La prise en charge thérapeutique que ce soit chirurgicale avec Ambroise Paré ou médicamenteuse, même en l'absence de traitements réellement efficaces, est à prescrire. Un peu plus tard au siècle des Lumières, Diderot et d'Alembert observent, décrivent et classent la douleur dans un article de l'Encyclopédie. La conception de la douleur à l'époque des Lumières se situe dans une perspective nosologique et sémiologique. Ainsi, la distinction est faite entre la douleur-signal d'alarme, qui annonce ou accompagne une crise, et la douleur seule qui n'a aucune utilité. François Boissier de Sauvages est le premier à écrire les termes de maladie douloureuse chronique (Traité des classes des maladies, 1731). Au XIX^{ème} siècle, avec la découverte de nouveaux traitements antalgiques, les premières interventions chirurgicales sous anesthésie sont autorisées, c'est le début de l'histoire de l'analgesie. Enfin, de la prise en charge antalgique à l'algologie, il n'y avait qu'un pas que le Dr John Bonica a franchi en proposant

Termes	Définitions
Algologie	Branche de la médecine qui s'intéresse à la douleur
Nociception	Processus nerveux par lequel le système somatosensoriel encode un stimulus nocif.
Nocicepteur	Récepteur sensoriel à haut seuil du système nerveux périphérique somatosensoriel capable de transduction et d'encodage de stimuli nocifs
Stimulus nocif	Stimulus préjudiciable ou menaçant d'endommager les tissus sains.
Douleur	Expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à des lésions tissulaires réelles ou potentielles ou décrites en des termes évoquant de telles lésions
Neuropathie	Affection du système nerveux soit périphérique (neuropathie périphérique) soit centrale (neuropathie centrale).
Douleur neuropathique	Douleur causée par une lésion ou une maladie affectant le système somatosensoriel.
Allodynie	Douleur due à un stimulus non nociceptif.
Hyperalgésie	Douleur exacerbée suite à un stimulus nociceptif.
Hyperpathie	Syndrome douloureux avec réaction accrue aux stimuli nociceptifs ou non, en particulier répétitifs, avec élévation du seuil de la douleur.

Tableau A1. Terminologie principalement utilisée en algologie. (IASP)

un concept d'approche multidisciplinaire de l'étude de la douleur. C'est tout naturellement qu'il fonde l'association internationale pour l'étude de la douleur en 1973 (International Association for the Study of Pain -IASP-), regroupant des scientifiques cliniciens et fundamentalistes.

II. Qu'est- ce que la douleur ?

1. Définition (Tableau A1)

Le fonctionnement harmonieux d'un organisme vivant est conditionné par un échange permanent d'informations entre son milieu interne et l'extérieur. Ainsi la douleur correspond à un signal complexe indiquant l'existence d'une altération dans une région donnée de l'organisme. Sa composante sensorielle préservée au cours de l'évolution (Kavaliers, 1988) est appelée nociception. Ce terme fut introduit par Sherrington en 1906 pour désigner le processus sensoriel à l'origine du message nerveux provoquant la douleur. La nociception correspond donc à l'ensemble des fonctions qui permettent de détecter, percevoir et réagir à des stimulations internes et externes potentiellement nocives. Les notions de nociception et de douleur ne sont pas superposables. On parle d'une sensation (phénomène physique) lors de l'emploi du terme nociception et de perception (phénomène psychologique) lors de l'emploi du terme douleur c'est-à-dire une interprétation consciente du stimulus nociceptif. En clinique, il est décrit des lésions tissulaires sans perception de douleur et, à l'inverse, des douleurs peuvent survenir en l'absence de cause nociceptive identifiée (Nagasako et al., 2003; Borsook and Becerra, 2009).

Ainsi, en s'inspirant des concepts d'Aristote et de Galien, l'IASP a défini la douleur comme étant « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle ou décrite en des termes évoquant une telle lésion ». Cette définition porte l'accent sur ce que sent, ressent, vit et décrit le patient, sans préjuger ni du mécanisme générateur, ni d'une quelconque notion de durée. En d'autres termes, on peut dire que : « Est douleur ce que le patient dit être douleur » (Muller, 1996).

La douleur est donc une expérience subjective dans laquelle Melzack et Casey ont distingué trois composantes (Melzack and Casey, 1968). La composante sensori-discriminative, mettant en jeu des voies sensitives relativement spécifiques, est liée à la capacité d'analyser la nature, la localisation, la durée et l'intensité de la stimulation nociceptive. La composante affectivo-

Aiguë	Chronique
Transitoire	> 3 à 6 mois
Signal d'alarme utile	Inutile
Protectrice	Destructrice
Symptôme : participe au diagnostic	Syndrome : Douleur-maladie

Tableau A2. Comparaison entre douleur aiguë et chronique.
(Boureau et al. 1988)

émotionnelle, au travers des régions corticales notamment préfrontales et limbiques, confère à cette sensibilité son caractère désagréable et provoque des réactions comportementales d'attention, d'anticipation, ou de fuites. Enfin, la composante cognitivo-évaluative regroupe les processus mentaux participant au traitement des nombreuses informations de l'expérience algique, comme la signification de la douleur perçue, le contexte situationnel, la référence aux expériences passées...

2. Douleur aiguë et douleur chronique (Tableau A2)

La douleur aiguë est due le plus souvent à une stimulation des nocicepteurs. Ce sont des récepteurs sensoriels à haut seuil du système nerveux périphérique somatosensoriel capables de traduire et d'encoder les stimuli nocifs (IASP). De fait, la douleur aiguë est une douleur symptôme et transitoire qui peut être assimilée à un signal d'alarme devant une agression tissulaire dangereuse pour l'intégrité de l'organisme (Guirimand and Le Bars, 1996; Scholz and Woolf, 2002; Guirimand, 2003). L'importance de cette fonction de protection est bien mise en évidence par les observations, rares, de morbidité dont sont atteints les sujets congénitalement insensibles à la douleur (Fath et al., 1983). En réponse à la douleur par stimulation nociceptive, le système nerveux déclenche des réponses musculaires réflexes, comportementales de fuite ou d'évitement ainsi que des réponses végétatives cardiovasculaires ou endocrines, ayant pour finalité biologique d'éliminer la cause et de limiter les conséquences néfastes de la stimulation nociceptive. La douleur possède également un rôle dans l'apprentissage adaptatif à travers les mécanismes de conditionnement qui vont limiter la répétition des actions potentiellement nocives (Sussman, 2008), d'où l'expression « Il faut être pris pour être appris ». Mais, comme toute fonction de l'organisme, le système nociceptif peut subir des dérèglements et le symptôme initial de douleur aiguë pourra alors devenir persistant et pathologique.

La douleur chronique, après 3 à 6 mois, est une douleur-maladie, un syndrome à part entière survenant dans des conditions pathologiques et persistant au cours du temps. Selon l'étiologie, qu'elle conserve ou perde sa fonction d'alarme, elle ne protège plus et devient ainsi néfaste pour l'organisme. En fait, ce qui caractérise le mieux la chronicité, indépendamment de la durée, de la cause initiatrice ou du mécanisme générateur de la douleur, ce sont les altérations comportementales qu'il est possible d'observer chez le patient et le retentissement sur sa vie. En effet la douleur-maladie va conditionner la vie de l'individu entraînant des troubles de l'appétit, du sommeil ou des troubles affectifs et ainsi retentir sur la vie quotidienne du

patient. Les statistiques de l'IASP révèlent de manière inquiétante que 20 % de la population mondiale souffre de douleurs chroniques et que près de 60 % des personnes qui prennent des médicaments antalgiques sur ordonnance éprouvent malgré tout des difficultés à participer à des activités sociales ou familiales (Brennan et al., 2007). Les douleurs chroniques ne constituent pas un groupe homogène mais peuvent être divisées, sur une base étiologique, en au moins deux grandes catégories. Certaines douleurs sont liées à une pathologie évolutive, qu'elle soit maligne (douleurs cancéreuses), infectieuse (douleurs post-zostériennes), métabolique (douleurs diabétiques), inflammatoire (douleurs arthritiques) ou provoquée par un traitement médicamenteux (douleurs iatrogènes). D'autres douleurs sont d'origine traumatique associées à une lésion nerveuse consécutive à des accidents, des blessures ou des actes chirurgicaux. Une hétérogénéité des douleurs chroniques peut relever de mécanismes générateurs différents tels que 1) l'excès de nociception résultant d'une stimulation exagérée des fibres nociceptives ; 2) les suites d'une maladie ou d'une lésion affectant le système somatosensoriel comme les douleurs neuropathiques ; 3) une cause psychogène liée à un désordre émotionnel sévère modifiant alors l'intégration du message nerveux conscient ; 4) une cause *sine materia* liée à des mécanismes encore mal connus comme les céphalées de tension, la fibromyalgie ou les douleurs myofasciales.

Lors de ce travail de thèse, les études ont été menées uniquement sur le sous-groupe de douleur chronique que sont les douleurs neuropathiques.

III. La douleur neuropathique

1. Définition

L'IASP a récemment redéfini la douleur neuropathique comme une « douleur consécutive à une lésion ou à une maladie affectant le système somatosensoriel » (Loeser and Treede, 2008), alors que dans une version antérieure l'IASP la définissait comme une « conséquence directe d'une lésion ou d'un dysfonctionnement du système nerveux primaire » (Merskey and Bogduk, 1994). Cette évolution de la définition est consécutive à des considérations d'ordre nosologique. En effet, si les douleurs liées à des lésions du système somatosensoriel périphérique ou central ont des caractéristiques sémiologiques, physiopathologiques et thérapeutiques comparables, d'autres douleurs relativement différentes, telles la migraine, la fibromyalgie ou le syndrome du côlon irritable bien qu'impliquant un dysfonctionnement du

système nerveux primaire, différent sur les plans physiopathologique et thérapeutique. D'un point de vue épidémiologique, près de 7% de la population française souffrirait de douleurs chroniques avec des caractéristiques de douleur neuropathique (Bouhassira et al., 2008), soit un quart des patients douloureux chroniques.

2. Etiologie centrale ou périphérique

Les douleurs neuropathiques peuvent être classées, en deux grands types, périphériques ou centrales, selon la localisation de la lésion neurologique causale (Attal et al., 2006).

Les premières sont caractérisées par l'existence d'une atteinte du système somatosensoriel périphérique. Selon la topographie, la distribution lésionnelle peut concerner un plexus (arrachement du plexus brachial), une racine (radiculopathie post-sciatique ou zostérienne), un tronc nerveux (lésion du nerf cubital au coude) ou être plus diffuse (polyneuropathies). Les situations étiologiques les plus fréquentes en France sont les douleurs post-zostériennes, les lésions nerveuses post-traumatiques ou post-chirurgicales (douleur du membre fantôme, thoracotomie), les compressions radiculaires chroniques par hernie discale, les neuropathies périphériques liées à des troubles métaboliques (diabète, éthylisme), à une infection (VIH) ou à l'action neurotoxique iatrogène des anticancéreux ou des antiviraux.

Dans le cas des douleurs neuropathiques centrales, la lésion peut intéresser les voies sensitives intramédullaires (les cornes dorsales, les cordons dorsaux ou plus souvent le faisceau spino-thalamique) ou les relais intracérébraux de la sensibilité (tronc cérébral, thalamus, cortex sensitif). Leur classification se base sur le territoire neurologique atteint. A l'étage médullaire, en cas de traumatisme la douleur est ressentie de façon bilatérale soit au niveau lésionnel (douleurs suspendues) soit au niveau sous-lésionnel (douleurs segmentaires). Dans le tronc cérébral, la pathologie douloureuse la plus fréquente est la conséquence du syndrome de Wallenberg qui est une atteinte ischémique intéressant le faisceau spinothalamique au niveau du bulbe et qui souvent se traduit par une anesthésie thermo-algique controlatérale de la face. Dans le thalamus, ce sont les séquelles d'accidents vasculaires localisés au noyau ventro-postéro-latéral (syndrome thalamique de Déjerine et Roussy) qui ont pour conséquence des douleurs intenses et une diminution de la sensibilité d'une moitié du corps. Enfin, lorsque la lésion est encéphalique, le plus souvent les douleurs sont observables à l'échelle d'un hémicorps.

Malgré les différences de topographie et d'origine lésionnelle entre douleurs périphériques et centrales, les caractéristiques sémiologiques et leurs prises en charge restent très voisines.

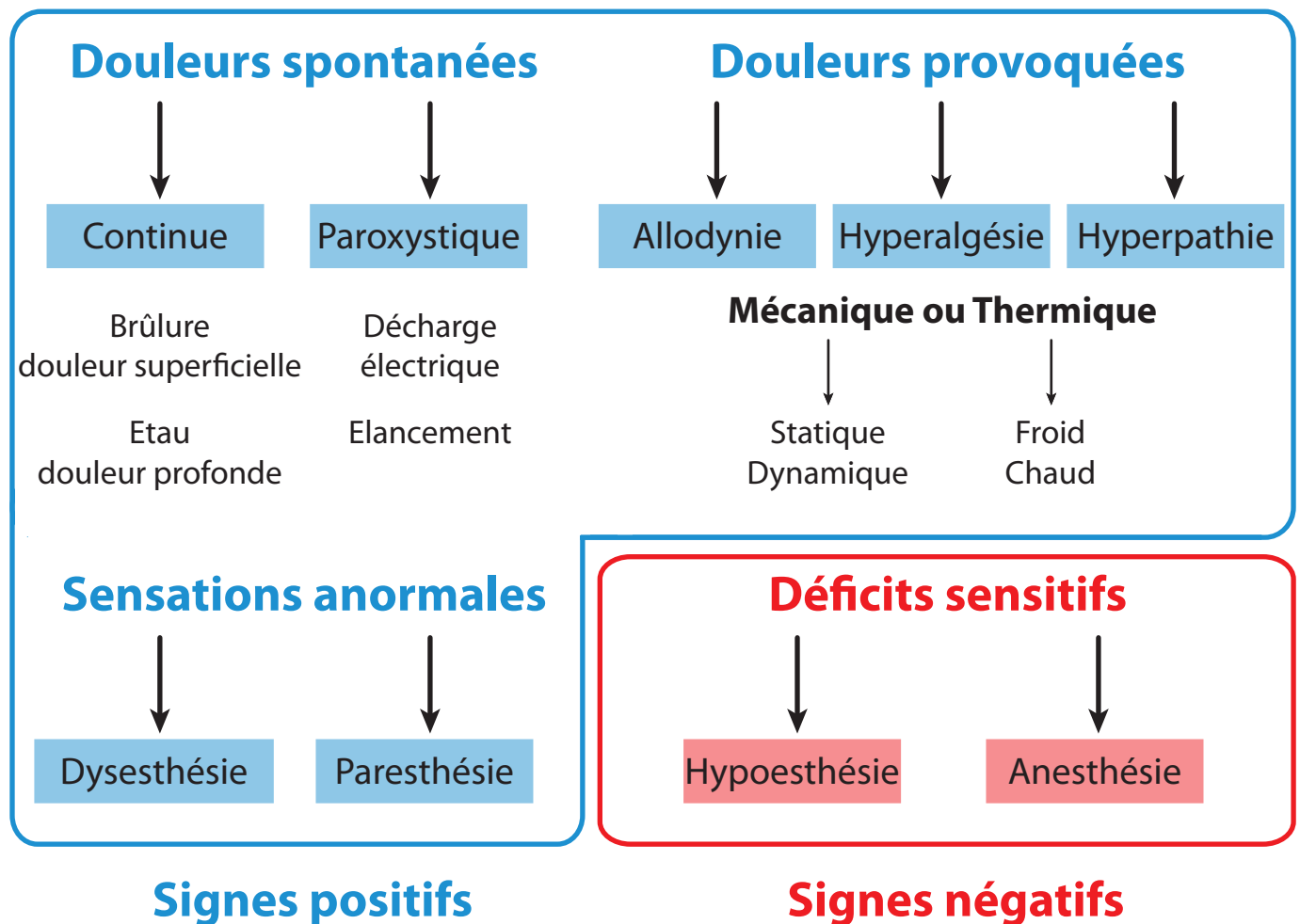


Figure A1. Sémiologie de la douleur neuropathique. (D'après Attal et al. 2006)

3. Sémiologie

a. Symptomatologie nociceptive

Les douleurs neuropathiques présentent des caractéristiques cliniques spécifiques qui les distinguent de toutes les autres douleurs. Elles sont dans la grande majorité des cas chroniques et séquellaires. En effet, un décalage temporel de quelques semaines à plusieurs années apparaît entre la lésion initiale et la survenue des douleurs neuropathiques post-lésionnelles. La topographie douloureuse est toutefois systématisée par rapport à la lésion neurologique causale, et la sémiologie clinique relevée est relativement stéréotypée, associant des symptômes douloureux dits positifs et négatifs (Attal et al., 2006; Baron, 2006) (**Figure A1**).

Les **symptômes positifs** sont définis par l'apparition de signes sensoriels supplémentaires, normalement absents en condition saine. Parmi ceux-ci, des symptômes non douloureux peuvent être perçus, il s'agit de sensations anormales comme les paresthésies qui sont des manifestations non douloureuses de fourmillements, d'engourdissements ou de picotements. D'autres sensations anormales sont appelées dysesthésies lorsqu'elles sont ressenties comme désagréables par le patient. Ces sensations anormales sont généralement présentes sur le même territoire que les symptômes douloureux. Les douleurs spontanées peuvent être continues, superficielles, souvent décrites comme des sensations de brûlure, ou profondes comme une sensation d'étau, de compression ou de crampes. Il peut exister également une composante paroxystique des douleurs spontanées, avec des sensations très caractéristiques de décharges électriques, d'élancements ou de coups de couteau. Ces douleurs spontanées sont fréquemment associées à des douleurs provoquées. On distingue classiquement d'une part l'allodynie mécanique déclenchée par des stimulations mécaniques non nociceptives comme le frottement d'un vêtement ou une légère pression, on parle alors d'allodynie mécanique dynamique ou statique, et d'autre part l'allodynie thermique déclenchée par des stimulations froides ou chaudes normalement non douloureuses. Un autre type de douleurs provoquées est l'hyperalgésie qui correspond à l'exacerbation de la douleur induite par des stimulations mécaniques ou thermiques nociceptives. Enfin, un autre symptôme peut être recherché, il s'agit de l'hyperpathie qui se caractérise par une réponse retardée, exagérée, souvent explosive et générée principalement par un stimulus répétitif, qu'il soit nociceptif ou non (**Tableau A1**).

Les **symptômes négatifs** sont définis par l'atténuation de fonctions sensorielles normalement présentes en condition saine. Les douleurs neuropathiques, au niveau de la zone neurologique lésée, peuvent également se manifester par la survenue d'un déficit partiel (hypoesthésie) voire complet (anesthésie) d'une modalité sensitive (**Tableau A1**).

b. Symptomatologie affective

En clinique, l'existence d'une relation entre douleur et troubles affectifs est maintenant bien établie (Huyser and Parker, 1999; Dersh et al., 2002). La douleur chronique peut en effet conduire chez certains patients à des états anxieux ou dépressifs et réduire la qualité de vie (Gallagher et al., 1995; Galer et al., 2000). Le risque de développer une dépression chez les patients douloureux chroniques est estimé à 50% (Blackburn-Munro and Blackburn-Munro, 2001), de plus une corrélation significative a pu être établie entre dépression et suicide dans une population douloureuse neuropathique (Nicholson and Verma, 2004). De manière intéressante, des études précliniques menées sur des modèles de douleur neuropathique ont révélées la survenue de troubles de l'humeur chez ces animaux (Goncalves et al., 2008; Yalcin et al., 2011a). Réciproquement, la dépression semble aussi être un terrain propice au développement de douleurs (Dworkin et al., 1995; Campbell et al., 2003). Cet aspect a pu être également modélisé chez l'animal, puisque une hypersensibilité sensorielle a pu être mesurée dans un modèle animal d'anxiété (Rivat et al., 2010). Ainsi, l'évaluation clinique du patient douloureux neuropathique résulte d'une relation bidirectionnelle entre douleur chronique et trouble de l'humeur.

4. Prise en charge thérapeutique

a. Traitement pharmacologique

La prise en charge des douleurs chroniques varie selon les mécanismes probables de la douleur. S'il s'agit d'une douleur inflammatoire, le traitement repose essentiellement sur les antalgiques ou les anti-inflammatoires de palier I, les opiacés faibles de palier II ou les opiacés forts de palier III. En revanche, les douleurs neuropathiques sont caractérisées par leur évolution chronique et leur résistance au traitement médical. En effet, elles ne répondent pas ou peu aux traitements antalgiques usuels (anti-inflammatoires non stéroïdiens, paracétamol, salicylés). Malgré une hétérogénéité étiologique, plusieurs classes

pharmacologiques ont fait la preuve de leur efficacité sur la base d'études contrôlées dans le traitement des douleurs neuropathiques. La plupart de ces traitements (à l'exception des topiques locaux) ont une efficacité similaire quelle que soit l'étiologie douloureuse (Attal et al., 2006; Attal et al., 2010).

Historiquement, le traitement des douleurs neuropathiques fait appel à des molécules anciennes, dont l'efficacité est obtenue au prix d'effets indésirables gênants, comme les **antidépresseurs tricycliques** (ATC). En effet, l'intérêt des antidépresseurs tricycliques est largement établi dans le traitement des douleurs neuropathiques variées (Collins et al., 2000), même si des résultats négatifs ont été rapportés dans les neuropathies douloureuses suite à une infection par le virus d'immunodéficience (VIH), les neuropathies des chimiothérapies et les douleurs d'origine médullaire (Kieburtz et al., 1998; Shlay et al., 1998; Cardenas et al., 2002; Hammack et al., 2002). Cependant, les inhibiteurs mixtes de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (IRSN) constituent une alternative thérapeutique aux tricycliques en cas d'intolérance ou de contre-indication, car en plus d'avoir fait preuve d'une efficacité sur des douleurs neuropathiques périphériques (Tasmuth et al., 2002; Sindrup et al., 2003), certains d'entre eux sont désormais recommandés dans le traitement de douleurs neuropathiques post-diabétiques, citons comme exemple la duloxétine (Anon., 2005). A noter qu'une autre classe d'antidépresseur, les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (IRS) sont parfois utilisés pour tenter de soulager la douleur neuropathique. Cependant, s'ils sont mieux tolérés que les antidépresseurs tricycliques, leur efficacité thérapeutique est controversée et reste à prouver chez des patients non-dépressifs (Wolfe and Trivedi, 2004; Sindrup et al., 2005). Nous reviendrons plus précisément sur le mécanisme d'action des antidépresseurs dans le dernier chapitre de l'introduction « Douleur neuropathique et antidépresseurs ».

Les **anticonvulsivants** constituent la seconde grande classe pharmacologique utilisée dans le traitement des douleurs neuropathiques (Collins et al., 2000; Jensen, 2002). L'action antalgique des anticonvulsivants reposerait sur le blocage de canaux calcium ou sodium. Les molécules les plus couramment prescrites et recommandées dans le traitement des douleurs neuropathiques sont la gabapentine ou la prégabaline (Gilron et al., 2006). Il s'agit de composés ligands de la sous-unité $\alpha 2\delta 1$ des canaux calcium, ils induisent une inhibition de la libération de neurotransmetteur (Field et al., 2006). Concernant le blocage des canaux sodium, il s'agit de composés peu utilisés compte tenu de leurs effets secondaires importants. Toutefois, certains d'entre eux comme la carbamazépine ou la phénytoïne sont utilisés dans le cas particulier de la névralgie du trijumeau.

Traitements pharmacologiques	Niveaux de preuves d'efficacité	Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en analgésie chez le patient adulte
Antidépresseurs tricycliques		
Amitriptyline (Laroxyl®)	Efficacité dans plusieurs étiologies	AMM douleur neuropathique périphérique
Imipramine (Tofranil®)	Efficacité dans plusieurs étiologies	AMM douleur neuropathique
Clomipramine (Anafranil®)	Efficacité dans plusieurs étiologies	AMM douleur neuropathique
Antidépresseurs IRSN		
Duloxétine (Cymbalta®)	Efficacité dans les polyneuropathies diabétiques	AMM douleur neuropathique périphérique diabétique
Venlafaxine (Effexor®)	Efficacité dans les polyneuropathies sensitives	Pas d'AMM
Anticonvulsivants		
Gabapentine (Neurontin®)	Efficacité dans plusieurs étiologies	AMM douleur neuropathique périphérique
Prégabaline (Lyrica®)	Efficacité dans plusieurs étiologies	AMM douleur neuropathique périphérique et centrale
Carbamazépine (Tegretol®)	Efficacité dans les névralgies du trijumeau	AMM douleur neuropathique, névralgie du trijumeau, névralgie du glossopharyngien
Phénytoïne (Di-Hydan®)	Efficacité dans les névralgies du trijumeau	AMM névralgie du trijumeau
Opiacés		
Tramadol (Topalgic®)	Efficacité dans la polyneuropathie diabétique	AMM douleur modérée à intense
Sulfate de morphine (Skenan®)	Efficacité dans plusieurs étiologies	AMM douleur persistante intense ou rebelle aux autres antalgiques, en particulier douleur d'origine cancéreuse
Oxycodone (OxyContin®)	Efficacité dans plusieurs étiologies	AMM douleur chronique d'origine cancéreuse intense ou rebelle aux antalgiques de niveau plus faible
Application topique		
Emplâtre de Lidocaïne	Efficacité dans les mononeuropathies associées à une allodynie	AMM douleur neuropathique post-zostérienne
Patch de capsaïcine (Qutenza®)	Efficacité dans les mononeuropathies post-zostériennes, VIH	AMM douleur neuropathique périphérique non diabétique

Tableau A3. Principaux traitements pharmacologiques des douleurs neuropathiques en France : niveau de preuve et AMM en analgésie.

Les **opiacés** sont aussi proposés dans certains cas dans le traitement de la douleur neuropathique. Le tramadol est une molécule d'action centrale, à faible risque de tolérance, dont l'efficacité analgésique est probablement liée à des mécanismes opioïdiques et non opioïdiques de type monoaminergique (sérotoninergique et noradrénergique). Son efficacité a été confirmée sur les polyneuropathies douloureuses et les douleurs post-zostériennes (Harati et al., 1998; Sindrup and Jensen, 1999). Il est également désormais établi que les morphiniques peuvent être bénéfiques sur les douleurs neuropathiques périphériques (Huse et al., 2001) ou centrales (Attal et al., 2002; Rowbotham et al., 2003). Cependant, les doses nécessaires à l'obtention d'un effet analgésique significatif dans les douleurs neuropathiques sont près de deux fois plus élevées que celles utilisées habituellement pour soulager les douleurs nociceptives (Benedetti et al., 1998).

L'efficacité d'**applications topiques** de lidocaïne a été démontrée sur des lésions nerveuses périphériques associées à une allodynie (Meier et al., 2003). L'utilisation d'une forte concentration de capsaïcine en patch dermique peut également fournir rapidement et durablement un soulagement de douleurs neuropathiques périphériques (Attal et al., 2010). Ces traitements ont l'avantage de présenter peu ou pas de risque d'effets indésirables systémiques.

Le **tableau A3** récapitule le niveau de preuve obtenu pour les classes thérapeutiques évaluées dans les douleurs neuropathiques ainsi que leur statut vis-à-vis de l'autorisation de mise sur le marché (AMM) (Martinez et al., 2010).

b. Traitement non pharmacologique

Même si l'intervention pharmacologique reste au centre du schéma thérapeutique, le traitement des douleurs neuropathiques peut également prendre d'autres formes, alternatives ou complémentaires aux traitements médicamenteux. Les techniques neurochirurgicales sont réservées aux patients qui ne peuvent pas être soulagés par des approches plus simples ou qui le sont au prix d'effets secondaires trop importants. Ainsi la section ou la destruction sélective de fibres nerveuses impliquées dans la conduction des informations nociceptives (drezotomie) constituent les principales techniques neurochirurgicales. La neurostimulation a été proposée comme une alternative aux techniques chirurgicales ou en complément d'une médication dans de nombreuses situations pathologiques telles la maladie de Parkinson, les troubles obsessionnels compulsifs, mais aussi dans certaines douleurs réfractaires à tout type de traitement (Cruccu et al., 2007). La stimulation médullaire semble efficace dans le traitement

des douleurs neuropathiques périphériques et centrales. La neurostimulation transcutanée est efficace sur la douleur neuropathique périphérique focale, notamment les neuropathies diabétiques et les lésions nerveuses post-traumatiques (Cruccu et al., 2008). La stimulation magnétique transcrânienne répétitive du cortex moteur n'est pas encore utilisée en routine mais semble efficace tout du moins à court terme dans le traitement des douleurs neuropathiques périphériques ou centrales (Fagundes-Pereyra et al., 2010). La psychothérapie, en particulier la thérapie cognitivo-comportementale peut être proposée dans la prise en charge de la douleur neuropathique en cas de comorbidité anxieuse et de difficulté d'appréhension de la douleur (Evans et al., 2003). Enfin, il existe également des présomptions d'efficacité de l'acupuncture dans les douleurs neuropathiques post-zostériennes (Valaskatgis et al., 2008) ainsi que de l'hypnose (Oneal et al., 2008).

B. Physiopathologie de la douleur neuropathique

I. De la physiopathologie clinique à la modélisation animale

L'étude de la physiopathologie de la douleur neuropathique chez l'homme permettrait d'accroître les connaissances mécanistiques dans le but de mieux adapter le traitement antalgique voire de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques. Cependant, hormis des études histologiques ou comportementales, les connaissances amassées chez l'homme sont relativement faibles en termes de mécanisme physiopathologique. Ainsi, en raison de difficultés d'études chez l'homme, les scientifiques pour décrypter des mécanismes moléculaires, cellulaires ou électrophysiologiques plus fins, ont mis en place des modèles animaux visant à reproduire une douleur neuropathique. Au cours de ces dernières années, nous avons assisté à une véritable explosion des travaux dans ce domaine avec le développement d'un nombre croissant de nouveaux « modèles » visant à apporter des éléments de réponse aux nombreux problèmes que posent ces douleurs, tant en ce qui concerne leur physiopathologie que leur prise en charge thérapeutique.

De façon schématique, on peut regrouper ces modèles en deux grandes catégories. Les premiers peuvent être considérés comme des modèles traumatiques dans la mesure où ils reproduisent une lésion physique du nerf ou de la moelle épinière. Les plus anciens sont représentés par les modèles traumatiques périphériques, comme la section complète d'un nerf périphérique ou de racines dorsales au niveau lombaire ou cervical (Basbaum, 1974; Lombard et al., 1979; Wall et al., 1979; Wiesenfeld and Lindblom, 1980). D'autres, moins drastiques, reposent pour la plupart sur une section ou ligature d'une partie de nerfs périphériques. Ces modèles génèrent des comportements douloureux neuropathiques chez l'animal, comme exemples, citons la pose de ligatures lâches autour du nerf sciatique (« Chronic Constriction Injury » ou CCI) (Bennett and Xie, 1988), le modèle de ligature partielle serrée du nerf sciatique (« Partial Sciatic nerve Ligation » ou PSL) (Seltzer et al., 1990), le modèle de ligature serrée des nerfs spinaux L5 et L6 (« Spinal Nerve Ligation » ou SNL) (Kim and Chung, 1992) ou encore le modèle de section de deux des trois branches distales du nerf sciatique (« Spared Nerve Injury » ou SNI) (Decosterd and Woolf, 2000). De plus, certains auteurs ont suggéré des modifications techniques (enserrement du nerf sciatique dans un manchon de polyéthylène) de façon à « standardiser » la lésion et limiter la variabilité liée à la

constriction manuelle du nerf sciatique dans le modèle de Bennett et Xie (Mosconi and Kruger, 1996; Benbouzid et al., 2008b). Au niveau central, la panoplie de modèles animaux est moins dense que celle concernant les modèles traumatiques de douleur neuropathique périphérique. La plupart des atteintes spinales chez l'homme résultent de fractures ou dislocations vertébrales entraînant des contusions compressives (Norenberg et al., 2004). Allen en 1911, après avoir réalisé une laminectomie, fut le premier à décrire un modèle de contusion spinale par lâchage d'un poids calibré sur la moelle épinière d'un chien (Schlesinger, 1991). Depuis de nombreux modèles ont été développés, chacun essayant d'affiner la méthode de contusion (Grill, 2005) (cf. **Figure C1** de la revue page 38).

Les seconds correspondent davantage à des modèles « non traumatiques », c'est-à-dire à un mécanisme lésionnel métabolique ou toxique que l'on peut rencontrer en clinique. Ils peuvent être soit d'origine pathologique soit iatrogène, comme exemple citons le modèle de neuropathie métabolique observée chez des rats rendus diabétiques par injection de streptozotocine (Wuarin-Bierman et al., 1987) ou le modèle de neuropathie périphérique induite par injection d'alcaloïde utilisé en chimiothérapie comme la vincristine (Aley et al., 1996), dont la neurotoxicité est connue de longue date en clinique.

Le développement de ces nombreux modèles de douleur neuropathique chez l'animal a permis de mieux comprendre la physiopathologie de ces douleur-maladies. Même si cette compréhension reste encore partielle, elle semble nous révéler une multiplicité de mécanismes. En effet, ces modèles ont mis en évidence l'importance et la complexité des modifications fonctionnelles, neurochimiques ou morphologiques des neurones ou de circuits neuronaux induites par les différents types de lésions et ont conduit à proposer plusieurs hypothèses physiopathologiques susceptibles de rendre compte des douleurs neuropathiques. Ces travaux ont surtout concerné les douleurs d'origine périphérique dans la mesure où la très grande majorité des études ont reposé sur l'utilisation de modèles de section ou de lésion partielle d'un nerf périphérique (souvent le nerf sciatique). Sur la base de ces travaux, il est généralement admis que les douleurs neuropathiques font intervenir des mécanismes périphériques au niveau des nerfs et des ganglions rachidiens et des mécanismes centraux au niveau de la moelle épinière et de l'encéphale (Scholz and Woolf, 2002; Campbell and Meyer, 2006; Costigan et al., 2009a).

II. Modifications périphériques

Suite à une lésion nerveuse périphérique, différents acteurs absents en condition physiologique vont entrer en jeu dans le développement et/ou le maintien de la douleur neuropathique en impliquant le nerf lésé et le ganglion rachidien correspondant, c'est ce qui est défini sous le terme de sensibilisation périphérique. Parmi les principaux mécanismes, nous nous intéresserons 1) au recrutement de cellules non neuronales ; 2) à la genèse d'activités nerveuses anormales ; 3) aux possibles remaniements histopathologiques, notamment à l'apparition d'une arborisation sympathique dans le ganglion rachidien ; 4) à l'implication d'un système de contrôle endogène de la douleur, le système opioïde.

1. Implication de cellules non neuronales

Les neurones ne sont pas les seules cellules à jouer un rôle dans la douleur neuropathique. De nombreuses évidences montrent que les cellules non neuronales immunitaires et gliales peuvent également être impliquées dans ces mécanismes physiopathologiques (Watkins and Maier, 2002; Moalem and Tracey, 2006; Scholz and Woolf, 2007; Thacker et al., 2007; Uceyler and Sommer, 2008).

En clinique, une lésion périphérique nerveuse provoque des réactions inflammatoires qui mobilisent le système immunitaire. De tels effets ne surviennent pas seulement après une infection neuronale, comme une névralgie post-herpétique (Zak-Prelich et al., 2003) ou dans des phénomènes d'auto-immunité, comme le syndrome de Guillain-Barré (Nyland et al., 1981) mais cette implication immunitaire a pu être constatée aussi suite à des traumatismes de nerf, comme la compression exercée par une tumeur (Benoliel et al., 2007) ou l'amputation d'un membre (Stremmel et al., 2005).

Dans les conditions physiologiques normales, les nerfs périphériques et les ganglions rachidiens contiennent, en plus des neurones, des cellules non neuronales différentes. Les cellules immunitaires résidentes comme les mastocytes, les macrophages ou les lymphocytes T sont utiles pour l'immunocompétence tissulaire. Durant les minutes et les heures qui suivent la lésion, les premières cellules à être recrutées au site de lésion du nerf sont les neutrophiles (ou leucocytes polymorphonucléaires), suivis par les monocytes circulants qui deviennent des macrophages après extravasation et finalement les lymphocytes T. A noter que ces cellules

immunitaires envahissent aussi les ganglions rachidiens contenant les corps cellulaires des fibres lésées.

Dans le système nerveux périphérique on distingue deux grands types de cellules gliales les cellules de Schwann associées aux axones des nerfs et les cellules satellites associées au soma des neurones sensoriels dans les ganglions rachidiens. Les cellules de Schwann myélinisantes et non myélinisantes assument différents rôles au cours du développement et chez l'adulte au cours d'atteinte nerveuse. Les cellules satellites comme les cellules de Schwann jouent un rôle dans la transmission nerveuse normale et lors de stimulations nociceptives en contrôlant l'homéostasie métabolique et ionique.

Dans différents modèles de neuropathie périphérique, les cellules deviennent activées et libèrent un certain nombre de médiateurs, comme les cytokines. Les cellules de Schwann subissent un changement phénotypique, en récupérant leur capacité à proliférer et à sécréter de nombreux médiateurs qui contribuent à la dégénérescence wallérienne (Campana, 2007). Celles-ci, tout comme les cellules satellites, sont capables de synthétiser en plus des cytokines des facteurs de croissance (Heumann et al., 1987; Dubovy et al., 2006) ainsi que des métalloprotéases qui induiront une perméabilité de la barrière hémato-nerveuse (Shubayev et al., 2006), permettant ainsi une extravasation accrue de leucocytes circulants.

Dans le chapitre suivant, nous verrons plus en détails que les cellules immunitaires et gliales, selon leur moment d'activation, sont impliquées dans des mécanismes de développement et/ou de maintien de la douleur neuropathique et que ces nombreux types cellulaires peuvent communiquer via différents médiateurs, notamment les cytokines (cf. chapitre page 30).

2. Implication de canaux ioniques

Si les canaux ioniques sont nécessaires au transfert de l'information nociceptive, il est probable qu'ils jouent un rôle important dans la physiopathologie de la douleur neuropathique (Hwang and Oh, 2007).

Canaux sodium. En clinique, l'utilisation thérapeutique courante d'anesthésiques locaux, telle la lidocaïne qui est un inhibiteur non sélectif de canaux sodium peut être recommandée pour certains types de douleur neuropathique (Sheets et al., 2008). Les neurones des ganglions rachidiens expriment de nombreux types de canaux sodium qui peuvent être soit sensibles soit résistants à la tétródotoxine (Fukuoka et al., 2008). Suite à une lésion nerveuse périphérique Nav1.3 est surexprimé dans les neurones des ganglions rachidiens et son invalidation locale chez l'adulte entraîne une diminution des symptômes neuropathiques (Hains et al., 2003).

Toutefois l'invalidation totale (knock-out) n'a pas confirmé son implication dans le comportement douloureux neuropathique ou la survenue de décharges ectopiques (Nassar et al., 2006). Suite à une lésion nerveuse périphérique, d'autres études montrent une diminution de l'expression de Nav1.8 dans les ganglions rachidiens lésés (Sleeper et al., 2000; Zhang et al., 2004) et une augmentation de son expression dans les ganglions rachidiens adjacents intacts (Zhang et al., 2004). Le canal TTX-résistant Nav1.8, qui est exprimé majoritairement par les nocicepteurs, ne semble pas jouer un rôle direct dans la propagation du potentiel d'action (Pinto et al., 2008), mais modulerait plutôt l'excitabilité membranaire particulièrement lorsqu'il est phosphorylé (Hudmon et al., 2008). Ainsi, cette diminution observée dans les neurones lésés serait peut être un mécanisme qui tend à s'opposer à l'installation de la douleur neuropathique. Des approches génétiques par invalidation locale ou pharmacologiques indiquent un rôle important de ce canal dans le développement de la douleur neuropathique (Gold et al., 2003; Roza et al., 2003; Ekberg et al., 2006; Joshi et al., 2006; Dong et al., 2007; Jarvis et al., 2007). Cependant, les souris déficientes pour le gène codant Nav1.8 n'ont pas confirmé ces résultats puisqu'elles ne présentent aucune modification du phénotype neuropathique par rapport aux souris sauvages (Nassar et al., 2005). Dans un modèle de douleur neuropathique post-diabétique, une augmentation de l'expression de Nav 1.7 ainsi que de sa phosphorylation ont pu être constatées (Hong et al., 2004). Suite à une lésion nerveuse périphérique, la délétion conditionnelle ou l'invalidation totale du canal Nav1.7 n'a eu aucune influence sur le développement du phénotype neuropathique (Nassar et al., 2005). Les délétions totales (souris KO) de ces canaux sodium ne semblent pas interagir sur le développement de la douleur neuropathique. Ces données obtenues peuvent être expliquées par des phénomènes de compensation et/ou de redondance. Une autre explication est peut être le fait que la douleur provoquée (allodynie et/ou hyperalgésie) ne soit pas le meilleur paramètre mesuré dans ces modèles animaux, puisque différentes données suggèrent que ces canaux sodium pourraient intervenir principalement dans des phénomènes de douleur spontanée (Amir et al., 2006).

Canaux calcium. Les canaux calcium représentent une des voies principales d'entrée du calcium dans les terminaisons des afférences primaires, où ils participent à l'excitabilité cellulaire et aux processus moléculaires de la transmission nociceptive. De fait, ces canaux semblent également jouer un rôle important dans le développement et/ou le maintien de la douleur neuropathique. En effet, l'expression du canal Cav2.2 est augmentée dans les ganglions rachidiens suite à une lésion nerveuse (McGivern, 2006). Les souris avec une délétion du canal Cav2.2 montrent une diminution du comportement associé à la douleur

neuropathique (Saegusa et al., 2001). L'injection intrathécale d'un bloqueur du canal Cav2.2 (ω conopeptide MVIIA) soulage les douleurs neuropathiques, probablement en réduisant la libération de neurotransmetteurs à partir du nocicepteur. Il est intéressant de noter que de nombreuses études ont montré une augmentation significative de la sous-unité $\alpha 2\delta 1$ dans de nombreux modèles de douleurs neuropathiques. La sous-unité $\alpha 2\delta 1$ contribue à la régulation des propriétés des canaux calcium voltage-dépendants en augmentant leur fonctionnalité ce qui aurait pour conséquence une augmentation de leur transport cellulaire (Canti et al., 2005). Cette augmentation d'expression, observée pour l'ARNm de la sous-unité $\alpha 2\delta 1$ (Newton et al., 2001) mais également pour la protéine dans les ganglions rachidiens (Li et al., 2004), coïncide avec l'apparition de l'allodynie mécanique dans le modèle de ligature des nerfs spinaux (Li et al., 2004). La surexpression de la sous-unité $\alpha 2\delta 1$ chez la souris entraîne l'apparition d'une allodynie mécanique en absence de toute lésion nerveuse (Li et al., 2006). De plus, il est intéressant de noter que la gabapentine et la prégabaline, qui constituent la première ligne du traitement des douleurs neuropathiques chez l'homme, sont des ligands de cette sous-unité (Brown and Gee, 1998; Field et al., 2006). Une lignée de souris exprimant une sous-unité $\alpha 2\delta 1$ présentant une mutation empêchant la fixation des gabapentinoïdes développe des douleurs neuropathiques insensibles à la gabapentine ou à la prégabaline (Field et al., 2006). Enfin, l'effet de cette sous-unité sur le transport intracellulaire des canaux calcium (Canti et al., 2005), plutôt que sur l'activité membranaire de ces canaux, pourrait être une explication du délai thérapeutique de quelques jours nécessaire aux gabapentinoïdes (Bauer et al., 2009). Tous ces arguments contribuent à valider le fait que cette sous-unité joue un rôle important dans le traitement des douleurs neuropathiques par certains anticonvulsivants.

Suite à une lésion nerveuse périphérique, la démyélinisation occasionnée peut provoquer une dysrégulation de la synthèse, de la répartition et/ou du fonctionnement des canaux ioniques et entraîner une « instabilité électrique » ce qui peut faire des canaux ioniques des acteurs importants de la survenue d'activités électriques anormales. En effet, une composante importante de la douleur neuropathique est la présence d'une douleur en l'absence de tout stimulus identifiable. Ces douleurs spontanées, en particulier quand elles sont paroxystiques, apparaissent notamment comme le résultat de la genèse de potentiels d'action ectopiques. Des enregistrements microneurographiques supportent cette idée de sensibilisation périphérique en démontrant une activité spontanée ectopique et des seuils de sensibilité réduits dans les afférences cutanées de patients douloureux neuropathiques suite à une amputation (Nystrom

and Hagbarth, 1981). De plus, de nombreuses évidences précliniques obtenues en condition de douleur neuropathique sont également en faveur d'un rôle prépondérant des afférences primaires dans la genèse de ces potentiels d'action ectopiques. Suite à une lésion nerveuse périphérique, une activité spontanée est générée comme par exemple au site de lésion, dans le soma et les terminaisons des neurones sensoriels lésés (Amir et al., 2005; Bostock et al., 2005) ou encore dans les neurones adjacents non lésés (Wu et al., 2001). Dans le cas particulier des lésions médullaires, la douleur spontanée peut résulter d'une augmentation de l'excitabilité intrinsèque de neurones spinaux recevant les informations périphériques (Hains and Waxman, 2007).

3. Système nerveux sympathique

Le système nerveux sympathique est une subdivision du système nerveux autonome efférent. Des neurones pré-ganglionnaires dont les corps cellulaires sont localisés dans la moelle épinière thoracique ou lombaire font synapse avec des neurones post-ganglionnaires dont les corps cellulaires sont localisés dans les chaînes ganglionnaires de chaque côté de la colonne vertébrale et dans des ganglions abdominaux. Les neurones post-ganglionnaires sont majoritairement noradrénergiques et innervent tous les viscères de l'organisme (Janig and Habler, 2000).

En condition physiologique, le système sympathique n'a pas d'interaction avec les neurones afférents du système somatosensoriel (Janig and Koltzenburg, 1991). Cependant, lors d'une lésion nerveuse un couplage pathophysiologique peut se développer entre des neurones sympathiques post-ganglionnaires et les afférences primaires, ce qui pourrait modifier la composante nociceptive et entraînerait un état douloureux (Devor, 1983; Stanton-Hicks et al., 1995). Cela concerne, en particulier, les syndromes douloureux régionaux complexes (SDRC), dans lesquels l'activité des efférences sympathiques peut contribuer à exacerber ou maintenir la douleur (Merskey and Bogduk, 1994). Par ailleurs dans certains cas de douleurs neuropathiques, une administration périneuromale de noradrénaline chez des patients amputés (Raja, 1998) ou sur le dermatome symptomatique de patients douloureux post-herpétiques, conduit à un accroissement de la douleur (Choi and Rowbotham, 1997). Les observations cliniques ont permis de classer ces douleurs en douleur dépendante (« Sympathetically Maintained Pain », SMP) ou indépendante (« Sympathetically Independent Pain », SIP) du système sympathique. Dans la sous-population de patients douloureux chroniques

sympathique-dépendants (SMP), une interruption transitoire (par bloc sympathique) ou permanente (par sympathectomie) mène à une diminution ou une abolition des symptômes douloureux, alors que ces traitements sympatholytiques restent inefficaces chez des patients SIP (Loh and Nathan, 1978; Bonica, 1990).

Les données obtenues dans des modèles animaux de douleur neuropathique révèlent que l'influence du système nerveux sympathique sur la douleur peut s'exercer à différents sites périphériques : au site de lésion (Wall and Gutnick, 1974; Devor and Janig, 1981), mais également dans les tissus situés en aval de la lésion comme par exemple la peau (Sato and Perl, 1991; Bossut and Perl, 1995; Ali et al., 1999), ou encore en amont de la lésion, dans les ganglions rachidiens (Burchiel, 1984; Devor et al., 1994; Petersen et al., 1996). L'essentiel des travaux précliniques se sont concentrés sur le ganglion rachidien. Le couplage sympathique-nociceptif pathologique est considéré comme un acteur potentiel des phénomènes de décharges anormales suite à une lésion nerveuse périphérique, et par conséquent à l'origine du développement et/ou du maintien de la douleur neuropathique (Chung et al., 1993; McLachlan et al., 1993). De plus, les effets d'une stimulation sympathique sur l'activité électrique des neurones des ganglions rachidiens sont mimés par l'application systémique ou locale d'un agoniste des récepteurs α_2 -adrénergiques (α_2 -AR). Réciproquement, l'effet sympathique pronociceptif est bloqué par l'administration d'un antagoniste α -AR, plus particulièrement de type α_2 -AR (Devor et al., 1994; Xie et al., 1995). Ces résultats sont confirmés par une étude clinique rapportant l'effet thérapeutique d'un traitement par un antagoniste α adrénergique chez des patients atteints de syndromes douloureux régionaux complexes (Inchiosa and Kizelshteyn, 2008). Ces effets peuvent s'expliquer soit par une diffusion (transmission volumique) dans le ganglion rachidien de noradrénaline libérée par les neurones post-ganglionnaires situés à proximité (Shinder and Devor, 1994; Shinder et al., 1999), soit par l'existence de contacts directs entre varicosités sympathiques et neurones des ganglions rachidiens (Chung et al., 1997).

En condition physiologique, les fibres noradrénergiques sympathiques sont décrites à proximité ou dans les ganglions rachidiens, elles innervent les vaisseaux sanguins. Par contre, lors d'une lésion nerveuse périphérique, des fibres sympathiques peuvent constituer une arborisation en panier autour des somas neuronaux des ganglions rachidiens (McLachlan et al., 1993). Ce bourgeonnement est peu présent voire absent des ganglions rachidiens d'un animal naïf (Matsuda et al., 2005). Lors d'une neuropathie périphérique, cette arborisation sympathique dans le ganglion rachidien peut avoir deux origines distinctes (Chung et al., 1993; McLachlan et al., 1993). D'une part, le bourgeonnement caractéristique du modèle de

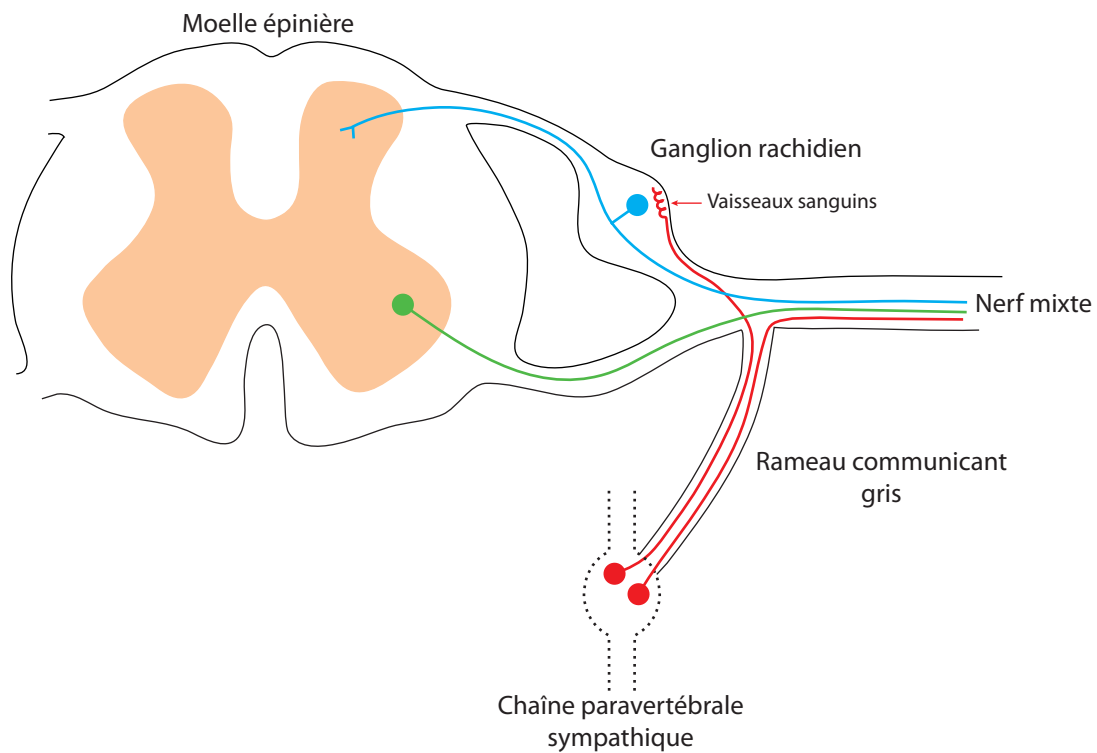


Figure B1. Anatomie de la région des ganglions rachidiens lombaires.

En condition physiologique, les afférences sensorielles (en bleu), dont les corps cellulaires sont situés dans le ganglion rachidien, quittent le nerf mixte, entrent dans la racine dorsale et vont établir des synapses dans la corne dorsale de la moelle épinière. Les motoneurones de la corne ventrale émettent des efférences motrices (en vert) qui passent par la racine ventrale pour rejoindre le nerf mixte et participer à la constitution des jonctions neuromusculaires. Les neurones post-ganglionnaires de la chaîne paravertébrale émettent des efférences sympathiques (en rouge) qui vont par le rameau communicant gris innover les vaisseaux sanguins du ganglion rachidien ou rejoindre le nerf mixte pour innover les organes périphériques.

Modèles de douleur neuropathique	Type de sympathectomie	Induction de la lésion	Allodynie mécanique	Hyperalgésie mécanique	Hyperalgésie thermique	Allodynie au froid	Références
Lésions proximales							
Ligature serrée des nerfs spinaux L5 et L6 (SNL)	Chirurgicale	1 semaine avant	↓↓↓ / Ø		↓↓↓		Kim et al. 1993 ; Lee et al. 2001, Choi et al. 1994 / Ringkamp et al. 1999
	Chirurgicale	Péri-opératoire	Ø			↓*	Lavand'homme et al. 1998 *Chung et al. 1996
	Guanéthidine / Phentolamine	Péri-opératoire	Ø				Lavand'homme et al. 1998
	Chirurgicale	4 jours après	↓↓↓		↓↓*	↓*	Chung et al. 1996 / *Kim et al. 1993,1997
	Chirurgicale	1 semaine après	↓↓↓ / ↓↓ / Ø		↓↓*		Kim et al. 1997 ; Lee et al. 2001 ; Choi et al. 1994 ; Kim et al. 1993 / Xie et al. 2001 / Ringkamp et al. 1999 *Kim et al. 1997
	6-OHDA	1 semaine après	Ø	Ø			Wei et al. 2002
	Guanéthidine / Phentolamine	2 semaines après	↓↓				Kim et al. 1997
	Chirurgicale	3 semaines après	↓↓↓ / Ø				Kim et al. 1991, 1997 / Ringkamp et al. 1999
	Chirurgicale	5 semaines après	↓↓↓				Kim et al. 1997
Exposition de la racine dorsale au nucleus pulposus	Chirurgicale	1 jour avant	↓↓		↓		Murata et al 2006
Lésion de la racine dorsale L5	Chirurgicale	Péri-opératoire	↓↓				Sekiguchi et al. 2008

Tableau B1. (1^{ère} partie)

Modèles de douleur neuropathique	Type de sympathectomie	Induction de la lésion	Allodynie mécanique	Hyperalgésie mécanique	Hyperalgésie thermique	Allodynie au froid	Références
Lésions distales							
Ligatures lâches autour du nerf sciatique (CCI)	Guanéthidine	5 jours avant		Ø	↓↓↓	↓↓↓	Neil et al. 1991
	Chirurgicale	Péri-opératoire		Ø	↓↓	↓↓↓	Desmeules et al. 1995
	Chirurgicale	1 semaine après	↓			↓	Kim et al. 1997
	Guanéthidine	10 jours après		↓	↓↓	↓↓↓	Neil et al. 1991
Ligature partielle serrée du nerf sciatique (PSL)	Guanéthidine	4 ou 7 jours avant	Ø		↓		Shir et al. 1991
	Guanéthidine	Péri-opératoire	↑		↑		Shir et al. 1991
	Chirurgical	1 semaine après	↓			↓	Kim et al. 1997
	Guanéthidine	10 jours après	↓		↓		Malmberg et Basbaum 1998
	Guanéthidine	7 mois après	↓↓↓		↓↓↓		Shir et al. 1991
Section des nerfs tibial et péronéal (SNI)	Guanéthidine	Du 8 ^{ème} au 21 ^{ème} jour post-natal	Ø	Ø		↓↓↓	Pertin et al. 2007
	Chirurgicale	1 semaine avant	Ø	Ø		↓↓	Zhao et al. 2007
Section des nerfs sural et tibial	Chirurgicale	1 semaine après	Ø				Han et al. 2006
Section du nerf tibial	6-OHDA	1 semaine avant			↓↓↓		Kingery et al. 2000
Cryoneurolyse du nerf sciatique	Chirurgicale	1 jour après / 2 mois avant	Ø				Willenbring et al. 1995

Tableau B1. (2^{ème} partie) Effet d'une sympathectomie sur une douleur neuropathique : résumé des principales études dans différents modèles animaux. La sympathectomie diminue légèrement (↓), fortement (↓↓), totalement (↓↓↓), n'a pas d'effet (Ø) ou aggrave (↑) les symptômes douloureux suite à une lésion nerveuse périphérique.

lésion proximale est issu de la régénération de l'efférence sympathique post-ganglionnaire qui est atteinte lors de la lésion (Chung et al., 1993; Ramer and Bisby, 1998, 1999), il se met en place dès la première semaine (Lee et al., 1998). D'autre part, il a été suggéré pour des modèles de lésion distale, que l'arborisation sympathique provenait de l'innervation sympathique des vaisseaux irriguant le ganglion rachidien (McLachlan et al., 1993; Ramer and Bisby, 1997, 1998, 1999) (**Figure B1**). Dans ce cas, le bourgeonnement sympathique n'est observable qu'après plusieurs semaines (Pertin et al., 2007). L'apparition d'un tel bourgeonnement est étroitement lié au développement d'une dégénérescence wallérienne suite à une lésion nerveuse périphérique (Ramer et al., 1997). En effet, les substances libérées par les cellules non neuronales comme le NGF ou l'IL-6 ont démontré des propriétés chemoattractantes pour les fibres sympathiques (Ramer et al., 1998b; Ramer et al., 1998a).

Pour étudier l'implication du système sympathique, de nombreuses études ont utilisé diverses méthodes sympatholytiques (pharmacologique avec la guanéthidine ou chirurgicale) sur différents modèles animaux de douleur neuropathique. La plupart de ces études sont référencées dans le **tableau B1**. Les résultats obtenus varient en fonction du modèle de lésion périphérique utilisée : soit proximale (exemple : SNL, nucleus pulposus,...), c'est-à-dire que la lésion est proche des ganglions rachidiens et sympathiques ; soit distale (SNI, PSL, CCI,...), c'est-à-dire au niveau du nerf périphérique. Le comportement neuropathique induit par le modèle de lésion proximal notamment l'allodynie mécanique semble étroitement dépendant de l'activité du système sympathique. Mais pour des modèles de lésion distale le système sympathique ne semble pas jouer un rôle important dans le développement ou le maintien de symptômes neuropathiques. Une faible contribution peut cependant lui être accordée pour des symptômes douloureux survenant après quelques mois, en particulier l'allodynie au froid (Pertin et al., 2007) (**Tableau B2**).

4. Système opioïdergique périphérique

Les peptides opioïdes (endorphines, enképhalines et dynorphines) exercent leur action à travers trois types de récepteurs opioïdes : μ - (MOR), δ - (DOR) et κ - (KOR). Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G inhibitrice ($G_{i/o}$). L'inhibition des canaux calcium voltage-dépendants est une conséquence de l'activation de ces récepteurs. Cependant, l'inhibition des canaux sodium résistants à la TTX est également observé (Gold and Levine, 1996). Les agonistes des récepteurs opioïdes peuvent ainsi atténuer l'excitabilité neuronale et la libération de

	Lésion distale	Lésion proximale	Références
Mise en place de l'arborisation sympathique	Lente (1 à 4 semaines post-induction)	Rapide (< à 1 semaine)	McLachlan et al. 1993; Ramer and Bisby 1999; Ramer and Bisby 1998; Chung et al 1996
Durée de l'arborisation sympathique	> à une année	> à 20 semaines (avec un pic de présence à 1 semaine)	McLachlan et al. 1993; Ramer and Bisby 1998; Thompson and Majithia 1997
Formation de synapse	Non	Oui	Ramer and Bisby 1998
Origine de l'arborisation	Innervation de la vascularisation	Repousse post-ganglionnaire à partir du rameau communicant gris	McLachlan et al. 1993; Ramer and Bisby 1999; Ramer and Bisby 1998; Chung et al 1996 ; Ramer et al., 1998
Douleur neuropathique dépendante du système sympathique	Non (« Sympathetically Independent Pain »)	Oui (« Sympathetically Maintained Pain »)	Ramer and Bisby 1999; Pertin et al 2007

Tableau B2. Synthèse sur l'implication du système nerveux sympathique dans la douleur neuropathique en fonction du modèle animal utilisé.

substances algogènes à partir des terminaisons nerveuses (Yaksh et al., 1988; Borzsei et al., 2008), et donc diminuer la transmission douloureuse (Machelska, 2007; Stein and Zollner, 2009).

La localisation des récepteurs opioïdes est relativement étendue puisqu'ils sont retrouvés aussi bien dans le système nerveux central que périphérique. Les observations concernant le système opioïde central seront développées dans la partie suivante traitant des mécanismes centraux de la douleur neuropathique. Les récepteurs opioïdes périphériques sont quant à eux synthétisés dans les cellules immunitaires (Sehgal et al., 2011) ou dans les corps cellulaires des neurones des ganglions rachidiens puis transportés intra-axonalement jusqu'aux terminaisons nerveuses (Minami et al., 1995; Li et al., 1998). Ils peuvent être stimulés par des agonistes opioïdes exogènes ou endogènes (Rau et al., 2005; Wang et al., 2010). Les peptides opioïdes endogènes sont synthétisés par les afférences primaires (Gibbins et al., 1987; Pohl et al., 1994) et les cellules immunitaires périphériques (Mousa et al., 2001). Les endorphines et les enképhalines contenues dans les cellules immunitaires semblent jouer un rôle important dans l'antinociception endogène puisque le degré d'inhibition de la douleur inflammatoire est proportionnel au nombre de leucocytes recrutés (Sehgal et al., 2011).

L'implication du système opioïdergique périphérique dans la douleur neuropathique concerne d'une part l'analyse de l'expression des récepteurs et des peptides opioïdes endogènes et d'autre part l'effet d'administration d'agonistes opioïdes exogènes.

Suite à une lésion nerveuse périphérique, les récepteurs opioïdes peuvent subir des changements d'expression de leur ARNm et/ou de leur protéine. Une diminution de l'expression génique des MOR est observée durant les semaines suivant l'induction de la neuropathie dans le ganglion rachidien, principal lieu de synthèse des récepteurs opioïdes. (Zhang et al., 1998; Rashid et al., 2004; Kohno et al., 2005). Toutefois, d'autres auteurs observent une augmentation de l'expression des MOR (Truong et al., 2003; Walczak et al., 2005) ou aucune modification (Kolesnikov et al., 2007). Des augmentations de l'expression protéique des DOR (Kabli and Cahill, 2007) et de l'expression de l'ARNm des KOR (Sung et al., 2000) sont également observées chez des animaux neuropathiques. Si la plupart des études se sont intéressées aux récepteurs opioïdes, quelques unes ont étudié l'effet d'une neuropathie sur l'expression des peptides opioïdes endogènes dans les ganglions rachidiens. Une diminution de l'expression de la préproenképhaline et une augmentation de la prodynorphine sont observées une semaine après l'induction de la neuropathie (Mika et al., 2010). Alors qu'à quatre semaines la diminution du précurseur de l'enképhaline subsiste toujours, l'expression de la prodynorphine est revenue à la normale (Herradon et al., 2008).

D'un point de vue fonctionnel, certaines études cliniques montrent qu'à doses fixes les opiacés exogènes sont inefficaces dans le traitement de la douleur neuropathique (Arner and Meyerson, 1988). Mais d'autres études révèlent une efficacité thérapeutique, par augmentation progressive des doses administrées (Portenoy et al., 1990; Rowbotham et al., 1991). Dans divers modèles animaux de douleur neuropathique, l'injection intrathécale de morphine est efficace contre l'hyperalgésie thermique (Mao et al., 1995; Wegert et al., 1997) mais inefficace contre l'allodynie mécanique (Bian et al., 1995; Lee et al., 1995). Cependant, d'autres études utilisant des administrations locales, intraplantaire ou intraneurale, suggèrent un effet thérapeutique de la morphine sur les composantes thermique et mécanique (Truong et al., 2003; Obara et al., 2007). Ces résultats sont appuyés par une étude relatant l'effet antalgique d'un agoniste MOR à action périphérique sur l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique (Guan et al., 2008). D'autres travaux rapportent que l'administration intrathécale (Mika et al., 2001; Holdridge and Cahill, 2007), *per os* (Petrillo et al., 2003) ou périphérique locale (Kabli and Cahill, 2007) d'agonistes des DOR diminue l'allodynie mécanique et thermique froide chez des animaux neuropathiques.

Un lien a été proposé entre l'activation des MOR ou des DOR et les réponses nociceptives respectivement thermiques et mécaniques (Scherrer et al., 2009). Ces données sont soutenues par le fait que chez des souris neuropathiques avec une délétion sélective des DOR périphériques, seule l'allodynie mécanique est exacerbée (Gaveriaux-Ruff et al., 2011). Cette séparation fonctionnelle MOR/DOR serait corrélée à une séparation anatomique, les MOR étant situés sur les afférences C peptidergiques et les DOR sur les fibres myélinisées et C non peptidergiques (Scherrer et al., 2009). Toutefois, cette dichotomie anatomique est controversée (Wang et al., 2010). D'un point de vue fonctionnel, on observe un effet bénéfique d'un agoniste DOR sur l'hyperalgésie thermique inflammatoire (Codd et al., 2009) ainsi que sur l'hyperalgésie thermique d'animaux neuropathiques (Gaveriaux-Ruff et al., 2011). De plus, une co-expression de ces deux récepteurs est retrouvée dans les mêmes neurones des ganglions rachidiens (Wang et al., 2010). Ainsi, cette dichotomie n'apparaît pas si stricte que cela. A propos des KOR, chez des animaux neuropathiques, l'administration systémique ou intraplantaire d'un agoniste KOR a un effet antinociceptif (Walker et al., 1999; Suzuki et al., 2001). Il est à noter que la dynorphine, contrairement aux autres agonistes KOR, peut avoir un effet paradoxal, à savoir que son administration intrathécale chez des animaux naïfs entraîne la survenue d'une allodynie mécanique (Vanderah et al., 1996; Laughlin et al., 1997), ce qui serait en accord avec les modifications géniques de prodynorphine observées en condition neuropathique.

III. Modifications centrales

Les douleurs neuropathiques s'accompagnent de modifications de l'activité neuronale, dans le système nerveux central également appelées « sensibilisation centrale ». Celle-ci est liée à des modifications de la transmission excitatrice et de la transmission inhibitrice au niveau spinal, à des changements d'activité de structures supraspinales et à des interactions neuro-immunogliales.

1. Augmentation de la neurotransmission excitatrice spinale

Même si l'utilisation clinique d'antagonistes des récepteurs NMDA comme la kétamine pour diminuer l'action des neurotransmetteurs excitateurs (Jorum et al., 2003; Chizh, 2007) peut être une option de traitement efficace des douleurs neuropathiques (Dworkin et al., 2007), mais l'inhibition de la transmission nerveuse ne constitue pas une preuve de l'implication de la neurotransmission spinale excitatrice des acides aminés excitateurs (AAE) dans la physiopathologie de la douleur neuropathique. Cependant, une lésion nerveuse périphérique induisant un comportement neuropathique produit une augmentation de l'activité des afférences primaires lésées ou non, ceci se traduisant par une augmentation de la libération évoquée de glutamate et d'aspartate (Paleckova et al., 1992; Kawamata and Omote, 1996) ou de la libération de substance P et de CGRP induite par un stimulus périphérique (Wallin and Schott, 2002; Gardell et al., 2003). Réciproquement, l'administration intrathécale d'AAE induit un comportement hyperalgésique chez un animal naïf (Aanonsen and Wilcox, 1987). D'autre part, les récepteurs correspondants peuvent également participer à la sensibilisation centrale lors d'une neuropathie. Il a été démontré que l'expression des récepteurs AMPA ou NK1 de la substance P est augmentée dans les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière dans un modèle de neuropathie périphérique (Harris et al., 1996; Croul et al., 1998). Une augmentation d'expression des ARNm des récepteurs AMPA et NMDA a également été démontrée dans un modèle de neuropathie diabétique (Tomiyama et al., 2005).

2. Diminution de la neurotransmission inhibitrice spinale

a. Perte de l'inhibition GABAergique

Le GABA est un neurotransmetteur important des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière où se terminent les afférences nociceptives. Il est essentiel pour réguler la sensibilité des neurones et des réseaux spinaux, et de nombreux arguments suggèrent qu'une altération de la transmission inhibitrice GABAergique dans la corne dorsale pourrait contribuer à la physiopathologie de la douleur neuropathique (Sugimoto et al., 1987; Woolf and Mannion, 1999). Après une lésion nerveuse périphérique, une diminution des potentiels post-synaptiques inhibiteurs liés au GABA est ainsi constatée dans les couches superficielles de la corne dorsale (Moore et al., 2002). Initialement, cette diminution a été présentée comme la conséquence d'une perte des interneurons inhibiteurs (Moore et al., 2002; Scholz et al., 2005). Mais il a été démontré depuis que d'une part la mort cellulaire observée est faible et non requise pour le développement d'une allodynie mécanique, et d'autre part seules les cellules gliales sont concernées par cette mort cellulaire (Polgar et al., 2005). Pour tenter d'expliquer la diminution d'activité GABAergique, d'autres études ont révélé une diminution de l'immunoréactivité GABAergique spinale (Ibuki et al., 1997), mais cela n'a pas été confirmé par microscopie électronique (Polgar and Todd, 2008). Une autre hypothèse suggère qu'une réduction de l'expression spinale du co-transporteur potassium/chlorure KCC2 provoquant une inversion du gradient anionique conduirait à modifier les courants synaptiques inhibiteurs en courants excitateurs lors d'une lésion nerveuse périphérique (Coull et al., 2003). Enfin, d'autres travaux plus récents suggèrent que la perte d'inhibition GABAergique pourrait être due à une diminution du tonus cholinergique (Rashid and Ueda, 2002), tonus nécessaire au maintien de l'inhibition GABAergique notamment *via* les récepteurs nicotiniques β_2 (Yalcin et al., 2011). Même si l'origine de la diminution de l'activité GABAergique reste encore à élucider, divers travaux ont clairement démontré son implication. En effet, l'injection d'agoniste GABA_A diminue l'allodynie et l'hyperalgésie neuropathiques mais n'a aucune action chez un animal naïf (Malan et al., 2002). Réciproquement, l'application intrathécale d'un antagoniste GABA, la bicuculline, produit des symptômes neuropathiques d'allodynie mécanique chez un animal naïf (Yaksh, 1989; Malan et al., 2002).

Bien moins étudiée que le GABA, un autre neurotransmetteur, la glycine, peut également contribuer à la douleur neuropathique (Zeilhofer, 2005).

b. Système opioïdergique central

L'injection intrathécale de morphine produit une analgésie observable à la fois chez l'homme et l'animal, qui est réversible par un antagoniste des récepteurs opioïdes, la naloxone. Dans la corne dorsale, les agonistes opioïdes *via* leurs récepteurs inhibent la transmission synaptique en bloquant les canaux calcium à la terminaison pré-synaptique. Mais ils peuvent également agir au niveau post-synaptique (Pan et al., 2008). Les douleurs neuropathiques périphériques ne répondent que modérément à une thérapie opioïdergique spinale ou systémique, et dans le cas où un effet est quantifiable, les doses utilisées doivent être croissantes, ceci provoquant des effets secondaires néfastes (Dworkin et al., 2003; Rowbotham et al., 2003). De plus, l'application intrathécale de morphine est relativement inefficace dans le traitement au long cours de la douleur neuropathique comparée à la douleur aiguë ou inflammatoire (Kohno et al., 2005). Des études récentes ont tenté d'expliquer ces observations cliniques par différents mécanismes spinaux. Par exemple, une lésion nerveuse périphérique a pour conséquence de réduire l'immunoréactivité MOR et son expression génique dans le soma et les terminaisons centrales des neurones de petit diamètre des ganglions rachidiens (Kohno et al., 2005; Zhang et al., 2007a). Les agonistes MOR perdraient ainsi leur capacité à inhiber la transmission synaptique entre l'afférence primaire et les neurones de la corne dorsale (Kohno et al., 2005; Kawasaki et al., 2006). Cette perte d'inhibition pourrait expliquer la perte de sensibilité aux opioïdes chez les patients neuropathiques. Concernant l'aspect fonctionnel, chez l'animal, cette perte spinale des MOR a pu être associée à une allodynie mécanique chez des animaux neuropathiques (Back et al., 2006). De plus, une lignée de souris déficientes pour les MOR présente des comportements neuropathiques exacerbés comparés au phénotype sauvage (Mansikka et al., 2004). Même si un antagoniste MOR augmente également l'allodynie mécanique dans un modèle de ligature et de section de nerf (Mansikka et al., 2004), d'autres données n'observent pas d'effet de l'administration de naloxone sur l'allodynie et l'hyperalgésie neuropathiques dans un modèle de ligature de racines dorsales (Wei et al., 1998; McGaraughty et al., 2005). Il est intéressant de souligner que c'est dans ce même modèle de ligature que des modifications d'expression des MOR avaient été relevées, suggérant que ces changements d'expression seuls ne sont pas capables de modifier l'activité opioïdergique (Stone et al., 2004) et donc d'expliquer une exacerbation du comportement neuropathique. D'autre part, divers modèles de douleur neuropathique périphérique mènent à une diminution de l'expression des DOR dans la moelle épinière (Stevens et al., 1991; Stone

et al., 2004). Notons également, que l'expression de ligands opioïdes endogènes apparaît diminuée aux niveaux spinal et supraspinal après section du nerf sciatique (Panerai et al., 1987). Les conséquences fonctionnelles sont difficiles à interpréter. En effet, les souris déficientes pour les DOR présentent une allodynie mécanique plus importante que les souris sauvages après la ligature partielle du nerf sciatique (Nadal et al., 2006), ce qui n'est pas le cas dans un modèle de constriction du nerf sciatique (Benbouzid et al., 2008b).

c. Contrôles inhibiteurs descendants aminergiques

Les voies descendantes inhibitrices noradrénergiques et sérotoninergiques ont pour origine des noyaux du tronc cérébral. Elles jouent un rôle important dans la modulation et l'intégration des messages nociceptifs dans la corne dorsale de la moelle épinière (Millan, 2002).

Suite à une lésion nerveuse périphérique, un bourgeonnement spinal des fibres descendantes noradrénergiques corrélé à une augmentation de la libération de noradrénaline a pu être observé (Ma and Eisenach, 2003; Hayashida et al., 2008). Pour les mécanismes antinociceptifs avancés, certains auteurs ont décrit une inhibition pré-synaptique par les récepteurs α_2 adrénergiques (α_2 -AR) de la transmission glutamatergique des afférences primaires (Kawasaki et al., 2003). Il a été observé qu'une lésion nerveuse périphérique augmentait l'efficacité du couplage des protéines G aux α_2 -AR, ce qui avait pour conséquence d'accroître la potentialité antinociceptive d'un agoniste α_2 -AR (Bantel et al., 2005). Ainsi, l'intérêt thérapeutique d'un agoniste α_2 -AR comme la clonidine a été établi suite à son administration spinale qui réduit des symptômes neuropathiques chez l'homme et l'animal (Hassenbusch et al., 2002; Paqueron et al., 2003).

D'autre part, après une lésion nerveuse périphérique, une réduction de la concentration spinale de sérotonine est constatée une semaine après l'induction de la neuropathie (Liu et al., 2010), alors qu'aucune différence n'est détectée après trois ou quatre semaines (Sato and Omote, 1996; Song et al., 2009; Liu et al., 2010). De plus, une diminution des récepteurs de la sérotonine 1B, 3, 4, et probablement 1A ou 2C a lieu dans la moelle épinière après une lésion de nerf (Liu et al., 2010). Tout ceci suggère que la diminution d'activité des voies descendantes sérotoninergiques inhibitrices pourrait avoir un rôle important seulement dans le développement de la douleur neuropathique (Suzuki et al., 2004; Apkarian et al., 2009). Cette diminution d'activité sérotoninergique débouche sur l'observation clinique que les IRS sont

peu efficaces dans le traitement des douleurs neuropathiques. Une étude suggère que ce manque d'efficacité serait dû au fait que les récepteurs de la sérotonine 2A en condition neuropathique seraient séquestrés à la membrane par une protéine post-synaptique la PSD-95, celle-ci empêchant l'action antinociceptive spinale de ces récepteurs. De fait, l'administration intrathécale d'un peptide se liant à cette protéine permet une dissociation du complexe protéine/récepteur et produit un effet antihyperalgésique. De plus, ce même peptide augmente l'effet antihyperalgésique d'un IRS la fluoxétine (Pichon et al., 2010).

Dans le cadre de la douleur neuropathique, la sensibilisation centrale reposerait en partie sur une dysrégulation des contrôles descendants, avec une diminution des voies inhibitrices et une augmentation des voies facilitatrices notamment issues du bulbe rostro-ventral (RVM).

3. Changements impliquant certaines structures supraspinales

En plus des changements observés dans la moelle épinière, différentes preuves expérimentales existent en faveur d'une implication de structures supraspinales. Des études cliniques utilisant des techniques de magnétoencéphalographie, de tomographie à émission de positrons et d'imagerie fonctionnelle par résonance magnétique ont révélé des changements corticaux ou sous-corticaux chez des patients douloureux neuropathiques (Flor et al., 1995; Hsieh et al., 1995; Willoch et al., 2000; Willoch et al., 2004). De façon intéressante, la relative spécificité de ces effets vis-à-vis de la douleur neuropathique est confortée par un certain nombre d'observations montrant leur réversibilité suite à des thérapeutiques pharmacologiques (Cahana et al., 2004), à des gestes chirurgicaux ablatifs (Di Piero et al., 1991) ou encore à une thérapie neurostimulatrice (Katayama et al., 1986; Peyron et al., 1995).

Pour le versant expérimental, il faut avant tout rappeler que les projections des neurones spinaux vers le tronc cérébral et le thalamus agissent sur les boucles descendantes vers la corne dorsale, qui en retour modulent le transfert ascendant de l'information nociceptive (Millan, 1999). Ainsi la sensibilisation centrale de la corne dorsale, pour être entretenue, nécessite la mise en jeu de mécanismes de facilitation descendante impliquant le RVM (Vera-Portocarrero et al., 2006). En effet, une étude menée avec un modèle de ligature partielle du nerf sciatique montre des modifications évoquant une activité pronociceptive dans les activités spontanées et évoquées des neurones du RVM (Goncalves et al., 2007). D'autres données rapportent une augmentation unilatérale de l'activité de ces neurones suite à une section du nerf sciatique (Pertovaara and Kauppi, 1989). De plus, après lésion nerveuse périphérique, les voies descendantes issues du RVM induisent une augmentation de la

libération de dynorphine spinale, mécanisme menant à la facilitation de la libération de peptides excitateurs comme le CGRP par les afférences primaires (Gardell et al., 2003). Concernant l'implication fonctionnelle, il a été montré que l'allodynie mécanique peut être abolie par la destruction sélective des voies descendantes du tronc cérébral dans le cordon dorsolatéral (Ossipov et al., 2000). De plus, la microinjection de lidocaïne dans le RVM conduit à une inhibition de son activité, ce qui a pour conséquence une abolition de l'allodynie et de l'hyperalgésie neuropathique (Burgess et al., 2002).

Dans des modèles de douleur neuropathique, des modifications de l'activité neuronale ont également été observées dans le thalamus. Ces altérations de l'activité unitaire thalamique correspondent à une hyperexcitabilité cellulaire conduisant à la fois à une augmentation de l'activité spontanée des neurones thalamiques somatosensoriels et à un accroissement de leur réponse évoquée par des stimuli périphériques ainsi que de leur champ récepteur (Guilbaud et al., 1990; Vos et al., 2000; Weng et al., 2000; Gerke et al., 2003). De plus, une hypoactivité métabolique dans le thalamus controlatéral est systématiquement retrouvée chez des patients douloureux neuropathiques (De Salles and Bittar, 1994; Hirato et al., 1994; Iadarola et al., 1995). Un lien direct a pu être mis en évidence entre cet hypométabolisme et l'augmentation de ces activités anormales (Hirato et al., 1994).

Même si les anomalies thalamiques décrites se répercutent à l'étage cortical, seulement quelques unes des aires corticales possèdent également des cellules avec des propriétés analogues à celles des cellules thalamiques, à savoir la possibilité de générer de manière autonome des activités anormales à la suite d'une neuropathie (Nunez et al., 1993). En effet, quelques semaines après une lésion nerveuse neuropathique, une augmentation anormale de l'activité des cellules du cortex somesthésique primaire est enregistrée (Dykes et al., 1995; Webster et al., 1997). D'autre part, des élévations locales du métabolisme cortical chez des patients douloureux neuropathiques ont été rapportées dans des structures du système limbique (Peyron et al., 2000; Apkarian et al., 2005). De la même façon en préclinique, on observe une augmentation de l'activité des neurones du cortex cingulaire ou amygdalien chez des animaux neuropathiques (Paulson et al., 2000; Paulson et al., 2002). Concernant la réorganisation histopathologique, le concept de « mémoire de la douleur » a été étudié dans différents territoires anatomiques et notamment dans l'aire somatosensorielle S1. En effet, une lésion nerveuse périphérique y induit rapidement et sélectivement un remodelage des synapses, phénomène associé au développement et au maintien à long terme de la douleur neuropathique (Kim and Nabekura, 2011). Chez l'animal, des lésions du cortex insulaire suppriment l'allodynie mécanique induite par une lésion du nerf sciatique mais sans affecter

les seuils nociceptifs de base (Coffeen et al., 2011). Alors que des lésions du cortex cingulaire antérieur n'affectent pas le comportement neuropathique (LaGraize et al., 2004), de telles lésions semblent supprimer les conséquences aversives de la douleur neuropathique (Qu et al., 2011). Finalement, l'expression « no brain, no pain » (Wall P.) illustre parfaitement le fait que certaines régions cérébrales jouent un rôle nécessaire dans l'intégration du message douloureux en condition neuropathique.

4. Interaction neuro-immuno-gliale

Dans le système nerveux central, en plus des neurones, des cellules non neuronales ont également été impliquées dans le développement et/ou le maintien de la douleur neuropathique (Garrison et al., 1991; Colburn et al., 1997; Watkins et al., 2001; Ren and Dubner, 2010; Vallejo et al., 2010).

En condition physiologique, les cellules gliales participent au maintien de l'homéostasie du système nerveux central, notamment par l'intermédiaire des astrocytes impliqués dans le métabolisme neuronal, de la microglie utile pour l'immunocompétence ou des oligodendrocytes responsables de la myélinisation des axones.

Cependant, suite à une lésion nerveuse chronique, astrocytes et microglie peuvent être activés notamment par l'ATP, fractalkine, MCP-1,... en provenance des afférences primaires et moduler l'activité neuronale adjacente (Ren and Dubner, 2008). De plus, tout comme au niveau périphérique, une invasion pathologique du système nerveux central, et plus particulièrement de la moelle épinière par des cellules immunitaires comme les macrophages ou les lymphocytes T, a pu être constatée suite à des lésions nerveuses centrales ou périphériques (Marchand et al., 2005; Gordh et al., 2006; Cao and DeLeo, 2008; Costigan et al., 2009b). Là encore les cellules non neuronales, une fois activées, sont capables de libérer différents agents inflammatoires comme l'ATP, les prostaglandines, des facteurs neurotrophiques ou encore des cytokines (Vallejo et al., 2010). Ainsi, par l'intermédiaire de ces dernières, les cellules non neuronales sont capables de communiquer entre elles mais également de moduler la transmission du message nociceptif via leur action sur les neurones.

Dans le chapitre suivant, nous reviendrons plus précisément sur le rôle des cytokines et l'implication du recrutement immuno-gliale dans les mécanismes pathologiques de la douleur neuropathique que ce soit d'un point de vue clinique ou préclinique.

C. Implication des cytokines dans la douleur neuropathique

Depuis quelques années, l'activation neuro-immuno-gliale au sein du système nerveux central est considérée comme un processus important dans l'étiologie de nombreuses maladies neurologiques, telle la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose en plaques... (Ruffolo et al., 1999; Wee Yong, 2010). Une approche thérapeutique de ces pathologies centrales consiste en l'utilisation d'une stratégie anti-inflammatoire et/ou immunosuppressive (Wood, 2000). Certaines de ces maladies sont aussi associées à des états de douleur persistante, il est ainsi apparu légitime d'imaginer une similarité entre les caractéristiques neurodégénératives de ces dysfonctionnements centraux et les mécanismes sous-jacents impliqués dans les douleurs chroniques (DeLeo and Yezierski, 2001). L'hypothèse fut vérifiée en étudiant une maladie dégénérative inflammatoire chronique, la polyarthrite rhumatoïde où le traitement de référence est l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens et stéroïdiens. De plus, la progression des connaissances physiopathologiques sur la polyarthrite rhumatoïde a mis en avant le rôle de certaines cytokines pro-inflammatoires et a ainsi permis le développement rapide de biothérapies, comme les anti-TNF- α (Sfikakis, 2010).

L'étape suivante fut de considérer l'implication potentielle de ces activations neuro-immuno-gliales comme substrat du développement et/ou du maintien des douleurs neuropathiques (Marchand et al., 2005; Vallejo et al., 2010). Ces activations impliquent de nombreux médiateurs dont les cytokines qui sont des protéines solubles qui sont sécrétées par les cellules immunitaires, gliales mais aussi dans certains cas par les neurones. Elles peuvent être classées en cytokines pro-inflammatoires le plus souvent algiques, en chimiokines, cytokines aux propriétés chimioattractantes et en cytokines anti-inflammatoires caractérisées pour leur rôle antalgique.

Le chapitre qui suit est une revue de la littérature. En prenant en considération à la fois les données humaines et animales, nous avons examiné le rôle des cytokines et leur potentialité thérapeutique dans le développement et/ou le maintien de la douleur neuropathique.

REVIEW PAPER

Cytokines in neuropathic pain: from physiopathology to therapeutic targets.

Yohann Bohren^{1,2}, Ipek Yalcin¹, Marie-José Freund-Mercier^{1,2}, Luc-Henri Tessier¹, Michel Barrot¹

¹*Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique, Strasbourg, France, and* ²*Université de Strasbourg, Strasbourg, France*

Running title: Targeting cytokines in neuropathic pain

Summary. Cytokines, such as interleukins, interferons, chemokines..., are soluble proteins predominantly secreted by a variety of immune cells, but also by glial cells from the nervous system. They regulate a wide array of physiological processes and disturbances in the cytokine system have been implicated in pathological situations, including cancer, auto-immunity, cardiovascular diseases or airway diseases. Clinical trials and use of anti-cytokine drugs in various disease conditions support the relevance of cytokines as treatment targets. In the pain field, cytokine-related implication and treatment, such as etanercept targeting the Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), were first described in processes leading to inflammatory pain. However, in the late 90's, evidence has been found implicating cytokines in a chronic pain condition that was not considered as inflammatory: neuropathic pain. Neuropathic pain arises as a direct consequence of a lesion or disease affecting the somatosensory system and is a neurological syndrome that is challenging to treat. Both academia and pharmaceutical/biotechnology research developed a growing interest for cytokines as potential targets for neuropathic pain management. The recent and fast increase in the number of clinical and preclinical publications on the topic illustrates this interest. In the present review, we critically assessed the current knowledge on cytokine implication in neuropathic pain and on direct or indirect cytokine-targeting treatment strategies for this condition, taking into consideration both human studies and animal models. This analysis of the literature highlights the physiopathological importance of cytokine recruitment and the therapeutic perspectives opened by manipulations of the cytokine system at different levels.

Key words. Neuropathic pain; Cytokine; Clinic; Animal model; TNF- α

Abbreviations. CCD, chronic compression of the dorsal ganglion; CCI, chronic constriction injury; COX-2, cyclo-oxygenase 2; EPO, erythropoietin; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GRO/KC, growth related oncogene; IFN, interferon; Ig, immunoglobulin; IL, interleukin; iNOS, inducible nitric oxide synthase; JAK/STAT, janus kinase signal transducer and activator of transcription; JNK, c-jun N-terminal kinase; LIF, leukemia inhibitory factor; MAPK, mitogen activated phosphorylated kinase; MCP, monocyte chemoattractant protein; MIP, monocyte inflammatory protein; NAPDH-oxidase, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase; Nav, voltage-gated sodium channel; NF- κ B, nuclear factor-kappa B; PSLN, partial sciatic nerve ligation; RANTES, Regulated on Activation Normal T-cell Expressed and Secreted; SNI, spared nerve injury; TGF, transforming growth factor; TLR, toll-like receptor; TNF, tumor necrosis factor.

<i>Families</i>	<i>Members</i>	<i>Targeted receptors</i>	<i>Receptor families</i>
Pro-inflammatory	IL-1 α, β	IL-1 receptor	Ig receptor family
	IL-2	IL-2 receptor (α, β, γ subunits)	
	IL-6	IL-6 receptor	Class I receptor
	IL-15	IL-15 receptor (α, β, γ subunits)	
	IL-18	IL-18 receptor	Ig receptor family
	LIF	LIF receptor	Class I receptor
	TNF- α	TNF- α receptors type 1 and 2	TNF receptor family
	IFN- γ	IFN receptor	Class II receptor
Anti-inflammatory	IL-4	IL-4 or IL-13 receptors	Class I receptor
	IL-10	IL-10 receptor (α, β subunit)	Class II receptor
	IL-13	IL-13 or IL-4 receptors	Class I receptor
	TGF- β	TGF- β receptors type 1 and 2	TGF- β receptor family
	Epo	Epo receptor	Class I receptor
	IL-1 RA	IL-1 receptor	Ig receptor family
Chemotactic	RANTES (CCL5)	CCR5, CCR4, CCR3, CCR1	
	MCP-1 (CCL2)	CCR2 or CCR5	
	MIP-1 α (CCL3)	CCR4 or CCR5	
	MIP-2 α (CXCL2)	IL-8 receptor β (CXCR2)	Chemokine receptor family
	IL-8	IL-8 receptors α and β (or CXCR1 and CXCR2)	
	Fractalkine (CX3CL1)	CX3CR1	

Table C1. Functional classification of cytokines. (Cameron and Kelvin, 2000)

Cytokines

Generalities

The term "cytokine" refers to secreted immunomodulating agents, such as interleukins and interferons. Cytokines are soluble proteins that are synthesized by a variety of immune cells such as neutrophils, macrophages or lymphocytes, but can also be produced by non immune cells like glial cells or fibroblasts. These informative molecules may act on the cells that produce them (autocrine action), or on nearby (paracrine action) or distant (endocrine action) cells when being released in general circulation. Most cytokines can be secreted by various cell types and can also target various cell types (pleiotropy). They are often produced in a cellular/molecular cascade, as one cytokine can stimulate its target cells to produce other one(s). The past decades have seen major progress in the identification, cloning and characterization of cytokines and their receptors (Bagley *et al.*, 2001; Rozwarski *et al.*, 1994). Cytokines act in concert with specific endogenous cytokine inhibitors and soluble cytokine receptors to regulate various physiological processes including embryogenesis (van Mourik *et al.*, 2009), reproductive biology (Ingman and Jones, 2008), hematopoiesis (Held and Gundert-Remy, 2009), angiogenesis (Benelli *et al.*, 2006), apoptosis (Abdulghani and El-Deiry, 2010), immune response and inflammation (Murtaugh and Foss, 2002). They are also involved in pathological situations such as auto-immunity, sepsis, human immunodeficiency virus (HIV) infection, cardiovascular diseases, depression (Corwin, 2000), cancer (Smyth *et al.*, 2004), chronic inflammatory diseases (Feldmann and Maini, 2008; Sanchez-Munoz *et al.*, 2008), airway diseases (Barnes, 2001), viral hepatitis (Larrubia *et al.*, 2009)...

Types of cytokines

In the pain field, cytokines can be classified according to their main function in nociception and pain processes, as presented in **Table C1**. Accordingly, they are usually grouped under pro-inflammatory cytokines, anti-inflammatory cytokines and chemokines (Cameron and Kelvin, 2000).

Pro-inflammatory cytokines produced by immune cells are mediators of inflammatory processes, from its initiation to its maintenance or amplification. These molecules include Interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-15, IL-18, Leukemia Inhibitory Factor (LIF), Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) and Interferon- γ (IFN- γ).

Anti-inflammatory cytokines are immunoregulatory molecules that antagonise the pro-inflammatory cytokine response. As they are often secondarily produced during inflammation, these cytokines participate in turning off the inflammation reaction. Major anti-inflammatory cytokines include IL-4, IL-10, IL-13, Transforming Growth Factor (TGF)- β and IL-1 Receptor Antagonist (IL-1 RA). Some cytokines like LIF, IFN- γ , IL-6, and TGF- β may also be categorized as either anti-inflammatory or pro-inflammatory cytokines depending on different circumstances (Barton *et al.*, 1996; Kingsley, 1994).

Besides cytokine-like activities, chemokines are characterised by their leukocyte chemoattractant properties (Asensio and Campbell, 1999) due to their cysteine residues (Crown *et al.*, 2006). Depending

on the cysteine arrangement, chemokines are usually divided into four subfamilies: C (e.g., Lymphotactin), CC (e.g., Regulated on Activation Normal T-cell Expressed and Secreted or RANTES, Monocyte Chemoattractant Protein or MCP-1, Monocyte Inflammatory Protein or MIP-1 α , and MIP-1 β), CXC (e.g., IL-8 also called Growth Related Oncogene or GRO/KC) and CX3C (e.g., Fractalkine) (Murphy *et al.*, 2000).

Cytokines can also be classified according to their type of receptor. On the basis of common structural features, the cytokine receptors are grouped into six major families: hematopoietin receptor family (class I cytokine receptors), interferon receptor family (class II cytokine receptors), TNF receptor family, Immunoglobulin superfamily receptors (IL-1 receptors), TGF- β superfamily and chemokine receptor family (Fitzgerald *et al.*, 2001; Leonard *et al.*, 1999; Thomson and Lotzke, 2003). Cytokine receptors may be either membrane-bound or soluble. Soluble cytokine receptors are extremely common regulators of cytokine function.

In the case of TNF- α , two receptors, TNF- α R1 (TNF- α receptor type 1; also designed as CD120a or p55/60) and TNF- α R2 (TNF- α receptor type 2; also designed as CD120b or p75/80) bind membrane-integrated TNF- α (mTNF- α) as well as soluble TNF- α (sTNF- α) (MacEwan, 2002). Interestingly, both receptors undergo proteolytic cleavage by metalloproteases, leading to the generation of their soluble forms which are still capable of binding TNF- α (Aderka, 1996).

Cytokines and pain

Data from animal experiments give unequivocal evidence for the crucial role of cytokines in the induction and maintenance of pain (Ferreira *et al.*, 1988; Scholz and Woolf, 2007; Thacker *et al.*, 2007). The application of pro-inflammatory cytokines or chemokines induces nociceptive behaviour (Junger and Sorkin, 2000; Oh *et al.*, 2001; Perkins and Kelly, 1994; Schäfers *et al.*, 2003b; Watkins *et al.*, 1994; Zelenka *et al.*, 2005) while treatment with anti-inflammatory cytokines or with inhibitors of pro-inflammatory cytokines is analgesic (Cunha *et al.*, 1999; Hao *et al.*, 2006; Maier *et al.*, 1993; Milligan *et al.*, 2005; Sommer, 1999; Sommer *et al.*, 2001; Vale *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 1998; Wieseler-Frank *et al.*, 2004).

IL-1 β , for example, can produce hyperalgesia following either intraperitoneal, intracerebroventricular or intraplantar injection (Perkins and Kelly, 1994; Watkins *et al.*, 1994). This cytokine also favours the production of substance P and prostaglandin E₂ by neuronal and glial cells. These molecules are recognised for their prominent role in pain processes (Jeanjean *et al.*, 1995; Schweizer *et al.*, 1988). Similarly, other pro-inflammatory cytokines display proalgesic properties. For example, intrathecal infusion of IL-6 induces tactile allodynia in intact rats (DeLeo *et al.*, 1996). In addition, IL-6 is involved in microglial and astrocytic activation (Klein *et al.*, 1997) which is an important modulator of nociceptive processes (Wieseler-Frank *et al.*, 2004) and may also results in production of other cytokines. Intraplantar injection of TNF- α produces mechanical (Cunha *et al.*, 1992) and thermal hyperalgesia (Perkins and Kelly, 1994). Reciprocally, systemic administration of the TNF- α binding

<i>Neuropathic symptom</i>	<i>Definition</i>	<i>Assessment</i>
Negative symptoms (sensory deficit)		
Hypoesthesia	Reduced sensation to non-painful stimuli	Touch skin with painter's brush, cotton swab, or gauze
Hypoalgesia	Reduced sensation to painful stimuli	Prick skin with single pin stimulus
Anaesthesia dolorosa	Pain in an area or region which is anaesthetic	
Positive symptoms (abnormal sensation)		
Paraesthesia	Abnormal sensation, whether spontaneous or evoked	Numerical rating scale (NRS) (0–100); area in cm ²
Dysaesthesia	An unpleasant abnormal sensation, whether spontaneous or evoked	NRS (0–100); area in cm ²
Positive symptoms (spontaneous pain)		
Paroxysmal pain	Episode of transient pain occurring in a context of chronic pain.	Number per time; NRS (0–100); threshold for evocation
Continuous pain	Painful ongoing sensation, often a burning sensation for superficial pain and originating in the viscera, muscles, and other deep tissues for deep pain	
Positive symptoms (evoked pain)		
Mechanical or thermal allodynia	Pain due to a stimulus which does not normally provoke pain. Touch (static), light pressure (dynamic), or moderate cold or warmth evoke pain when applied to apparently normal skin	Stroke skin with painter's brush (dynamic); Apply manual mechanical pressure to skin (static); Contact with 20°C objects (cold); Contact with 40°C objects (heat)
Mechanical or thermal hyperalgesia	An increased response to a stimulus which is normally painful (dynamic/static or cold/heat)	

Table C2. Symptomatology of neuropathic pain (adapted from Baron, 2006).

protein, a soluble form of a transmembrane TNF- α receptor acting as TNF- α inhibitor, suppresses lipopolysaccharide (LPS)-induced hyperalgesia (Watkins *et al.*, 1994).

On the other hand, administering IL-10, an anti-inflammatory cytokine in diverse animal models can suppress the development of spinally-mediated pain facilitation by repressing the expression of inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6 and IL-1 (Wieseler-Frank *et al.*, 2005). Similarly, TGF- β either suppresses pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-2, IL-6, and TNF- α) by inhibiting macrophage and T helper lymphocyte activity or induces an anti-inflammatory cytokine IL-1RA (Roberts and Sporn, 1993). Administration of IL-1RA, a specific IL-1 receptor antagonist, also attenuates cytokine mediated inflammatory hyperalgesia by blocking IL-1 β -mediated cellular changes (Maier *et al.*, 1993).

Since the initial work of Ferreira's group, who first identified a cytokine, IL-1 β , as a mediator of inflammatory hyperalgesia in 1988, the implication of cytokines has been widely studied in the acute and chronic inflammatory pain processes. In 1996, further progress was made, linking cytokines and pain. Wagner and Myers suggested for the first time that the production of a pro-inflammatory cytokine (TNF- α) may also have a role in the hyperalgesia associated with neuropathic pain (Leung and Cahill, 2010; Wagner and Myers, 1996). Since then, there is a growing body of clinical and preclinical evidence concerning cytokine implication in neuropathic pain. In the present review, we are specifically addressing this implication, and the potential of cytokines as direct or indirect therapeutic targets for neuropathic pain.

Cytokines as actors and targets in neuropathic pain: clinical data

Neuropathic pain

Neuropathic pain is usually a chronic pain condition which affects the quality of life of patients. By definition, it arises as a direct consequence of a lesion or disease affecting the somatosensory system (Loeser and Treede, 2008). Other types of chronic pain, such as fibromyalgia or complex regional pain syndrome, are not considered as neuropathic pain and will not be discussed in this review.

Neuropathic pain is not a disease per se, but rather a symptom with various possible aetiologies. For most patients it has a peripheral origin, arising as a consequence of peripheral nerve injury (nerve section or compression) or as a consequence of a metabolic disease such as diabetes. Nerve injuries and diabetic peripheral neuropathy account for almost two-thirds of the patients. However, neuropathic pain can also result from infectious diseases, as in post-herpetic neuralgia, from exposure to neurotoxic compounds, such those used for cancer chemotherapy, or be of central origin, as observed after spinal cord injury or local post-stroke ischemia (Attal *et al.*, 2008).

Neuropathic pain is characterized by both positive and negative symptoms (Attal *et al.*, 2008) (**Table C2**). The positive symptoms include abnormal sensations like dysaesthesia, spontaneous pain that may be continuous or paroxysmal, or provoked pain like allodynia or hyperalgesia. Often, patients with neuropathic pain also display negative symptoms such as anaesthesia or hypoesthesia.

From the therapeutic point of view, neuropathic pain is challenging to treat. It is resistant to usual anti-inflammatory analgesics. Moreover, although opiates may be employed against chronic pain, alleviation of neuropathic pain is problematic as high doses are often required (Hempnall *et al.*, 2005). In their practice, clinicians are mostly using molecules initially developed to treat other disorders of the nervous system, such as anticonvulsant drugs, tricyclic antidepressant drugs, or serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors (Colombo *et al.*, 2006; Coluzzi and Mattia, 2005; Mico *et al.*, 2006; Saarto and Wiffen, 2005). These molecules are clinically recommended as first line treatments for neuropathic pain (Attal *et al.*, 2006; Gilron *et al.*, 2006; Moulin *et al.*, 2007). Their clinical use is however limited, both due to their side effects and to non-responsive patients. Hence, a complete understanding of the cellular and molecular processes involved in the development and maintenance of neuropathic pain as well as the mechanism of action of drugs used against neuropathic pain, is essential for the development of novel therapies.

Cytokines in neuropathic pain patients

Few clinical studies have addressed the production of cytokines in a neuropathic pain context. Most of them have been devoted to peripheral nerve damage due to a physical injury or a metabolic disease, but some studies also focused on other causes of neuropathic pain, such as central neuropathy following spinal cord injury. In these studies, analysed samples were obtained from different body fluids (blood, cerebrospinal fluid) and tissues (nerve and dorsal root ganglia biopsies). While detailed results are variable, the main findings are consistent among studies.

In the hours following spinal cord injury, increased levels of IL-6, IL-8 and MCP-1 are observed in patient cerebrospinal fluid (Kwon *et al.*, 2010). On a longer term, from weeks to years following the injury, most patients display elevated serum concentrations of pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α (Davies *et al.*, 2007). Interestingly, IL-6 levels are further elevated in spinal cord injury patients who also display neuropathic pain symptoms. These findings suggest that cytokines may be recruited in both early and late stages of central neuropathy and suggest a potential relationship between the cytokine level and neuropathic pain.

As mentioned before, most studies have examined the consequences of peripheral neuropathic pain on cytokine expression. Increased IL-6 concentration and IFN- γ mRNA levels and decreased anti-inflammatory cytokine IL-13 mRNA levels were observed in avulsed dorsal root ganglia which were surgically removed following traumatic injury to the brachial plexus (Rabert *et al.*, 2004; Saldanha *et al.*, 2000). Using sural nerve biopsies, increased levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α were observed in patients with sciatic neuropathic pain compared to controls (Empl *et al.*, 2001; Lindenlaub and Sommer, 2003). Immunohistochemical analyses revealed that this elevation was particularly striking in Schwann cells (Empl *et al.*, 2001), which are the principal glia of the peripheral nervous system and are implicated in the myelination of axons (Garbay *et al.*, 2000). While local cytokine recruitment is observed with peripheral nerve injury, these changes can also be detected at a more systemic level. Indeed, the serum

levels of TNF- α , IL-6 and IL-2 were shown to be increased in patients with peripheral nerve injury compared to healthy controls (Kraychete *et al.*, 2009; Uceyler *et al.*, 2007a), whereas concentrations of the soluble receptor TNF- α R1 did not vary. In addition, the elevations in cytokine concentrations appear to be related to painful symptoms. A study revealed no overall difference between patients with or without polyneuropathies for IL-6 and TNF- α concentrations in plasmatic or cerebrospinal fluid, whereas in the polyneuropathic subpopulation patients with mechanical allodynia have elevated plasmatic TNF- α levels compared to those without allodynia (Ludwig *et al.*, 2008). Similarly, no difference in sTNF- α R1 serum concentrations was observed between painful neuropathy and painless neuropathy conditions, however neuropathic patients with mechanical allodynia displayed higher sTNF- α R1 serum levels than neuropathic but non-allodynic patients (Empl *et al.*, 2001). These findings suggest that elevated TNF- α levels and/or function may be more specifically related to the allodynic component of neuropathic pain. Moreover, TNF- α and IL-6 serum levels are higher in patients with severe neuropathy compared to those with mild neuropathy, thus showing a positive correlation with severity of neuropathy (Ludwig *et al.*, 2008). On the other hand, it has also been reported that patients with painless neuropathy had higher blood levels of anti-inflammatory cytokines, especially IL-10 (Uceyler *et al.*, 2007a).

Patients with post-herpetic neuralgia present elevated levels of IL-8 in cerebrospinal fluid, which was described as a potential predictor for the development of pain after Herpes zoster infection (Kotani *et al.*, 2004). However, no difference was found comparing serum cytokine levels between post-herpetic neuralgia patients and controls (Zak-Prelich *et al.*, 2003).

Finally, elevated plasma levels of TNF- α (Doupis *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009), or RANTES (Doupis *et al.*, 2009) were observed in diabetic neuropathic patients compared to non neuropathic diabetic patients or to healthy controls.

Despite some discrepancies, the clinical studies suggest that chronic neuropathic pain is often associated with an increased expression of pro-inflammatory cytokines and chemokines and a decreased expression of anti-inflammatory cytokines. It is not yet clear whether these changes are independent from or specific to the aetiology of the neuropathy. Side by side comparison of the same parameters in different types of neuropathy would be necessary to answer this point. However, some data suggest a potential link between cytokine levels and specific symptoms of neuropathic pain, such as allodynia. Moreover, it appears that the concept of an imbalance between algescic pro-inflammatory and analgesic anti-inflammatory cytokines as described for inflammatory pain can also somewhat be adapted to neuropathic pain.

Cytokine-targeted treatments

Pro-inflammatory cytokine levels appear to correlate with the severity of the neuropathy and/or the presence of allodynia (Empl *et al.*, 2001; Ludwig *et al.*, 2008). Some anticytokine agents are clinically available and demonstrate their effectiveness in severe inflammatory conditions, such as rheumatoid

<i>Treatments</i>	<i>Targets</i>	<i>Indications</i>	<i>Frequent side effects</i>	<i>Reports in neuropathic pain</i>
Etanercept (Enbrel®)	Protein "fusing" TNF- α receptor to Ig G, that binds TNF- α	Rheumatoid arthritis, Polyarticular juvenile idiopathic arthritis, Psoriatic arthritis, Ankylosing spondylitis, Plaque psoriasis	Infections, Prurit, Hypersensitive disorder, Malignant tumor	Tobinick and Davoodifar, 2004; Cohen <i>et al.</i> , 2007; Dahl <i>et al.</i> , 2008
Infliximab (Remicade®)	Monoclonal antibody against TNF- α	Rheumatoid arthritis, Ankylosing spondylitis, Psoriatic arthritis, Plaque psoriasis, Crohn's disease, Ulcerative colitis	Infections, Cephalgia, Hypersensitive disorder, Nausea, Diarrhea, Prurit, Fatigue	Korhonen <i>et al.</i> , 2004, 2005
Aldesleukin (Proleukin®)	Recombinant IL-2 mediates its effect by binding to IL-2 receptor	Metastatic renal cell cancer, Metastatic melanoma	Hypotension, Oliguria, Diarrhea, Nausea, Dyspnea, Pancytopenia	Rotty <i>et al.</i> , 2006

Table C3. Anticytokine agents and their side effects.
(Sfikakis, 2010; Whittington and Faulds, 1993)

arthritis, ankylosing spondylitis, psoriasis, inflammatory bowel disease (Sfikakis, 2010; Zidek *et al.*, 2009) and recently in the management of neuropathic pain.

Etanercept (Enbrel®) is one of the major anticytokine drugs clinically used. It corresponds to the soluble dimeric form of the TNF- α receptor, genetically fused with the Fc portion of immunoglobulin G. It acts as a competitive inhibitor of TNF- α binding to TNF- α receptors, and hence inhibits biologic activity of TNF- α . Etanercept has an approximate 50-fold greater affinity for TNF- α in a binding-inhibition assay, and is at least 1000 times more efficient than the monomeric sTNF- α receptor (Madhusudan *et al.*, 2005). Moreover, it reversibly binds to TNF- α with a longer half-life than the endogenous membrane receptor (Tayal and Kalra, 2008). These characteristics of etanercept result in its ability to neutralize the biologic effects of TNF- α .

Clinical studies showed that extradiscal perispinal etanercept injections at a dose of 25 mg lead to significant improvement in patients with chronic, treatment-refractory disc-related pain in an open-trial (Tobinick and Davoodifar, 2004). However, this finding was not confirmed by a double-blind, placebo-controlled study which used much lower doses (0.1 to 1.5 mg) (Cohen *et al.*, 2007). These discrepancies may be due to the different doses, and mode or duration of administration used in these studies. Indeed, the study of Cohen *et al.* showed a lack of therapeutic action with a single low dose of intradiscal etanercept, while Tobinick and Davoodifar used repeated extradiscal injections at a much higher dose. A more recent case report on soldiers with residual limb and phantom pain, treated with a series of perineural etanercept injections (5 mg each) showed significant improvements in phantom limb pain (Dahl and Cohen, 2008). In two other studies, including a randomised controlled trial and an open-label trial, intravenous infliximab (Remicade®) which is a monoclonal antibody against TNF- α , was found to relieve lumbar radiculopathy (Korhonen *et al.*, 2004; Korhonen *et al.*, 2005).

Besides the above examples concerning TNF- α manipulation, another case report described the successful treatment of a patient with post-herpetic neuralgia using subcutaneously applied IL-2 (Rotty *et al.*, 2006). IL-2 is a cytokine with either pro- or anti-inflammatory features, depending on the context, and appears to have analgesic effects in most preclinical models (Jiang *et al.*, 2000).

As an alternative to direct targeting of cytokines, indirect approaches manipulating intracellular pathways associated with cytokine production and/or action have also been tested. Indeed, Dilmapiomod, a potent inhibitor of p38 MAPK, which inhibits cytokine production in patients with chronic obstructive pulmonary disease (Singh *et al.*, 2010), has also been shown to reduce neuropathic pain symptoms in patients with nerve injury (Anand *et al.*, 2011). Similarly, AV411 (ibudilast), a phosphodiesterase inhibitor originally developed for treating bronchial asthma (Rolan *et al.*, 2008), was under clinical trials in the USA and in Australia for treatment of diabetic neuropathic pain; however results are not yet published (Leung and Cahill, 2010).

The systemic use of anticytokine agents may be limited because of their pleiotropic action that causes many side effects (**Table C3**) (Sfikakis, 2010; Whittington and Faulds, 1993). For this reason, several authors suggested the concept of local administration of these drugs for pain relief. While some

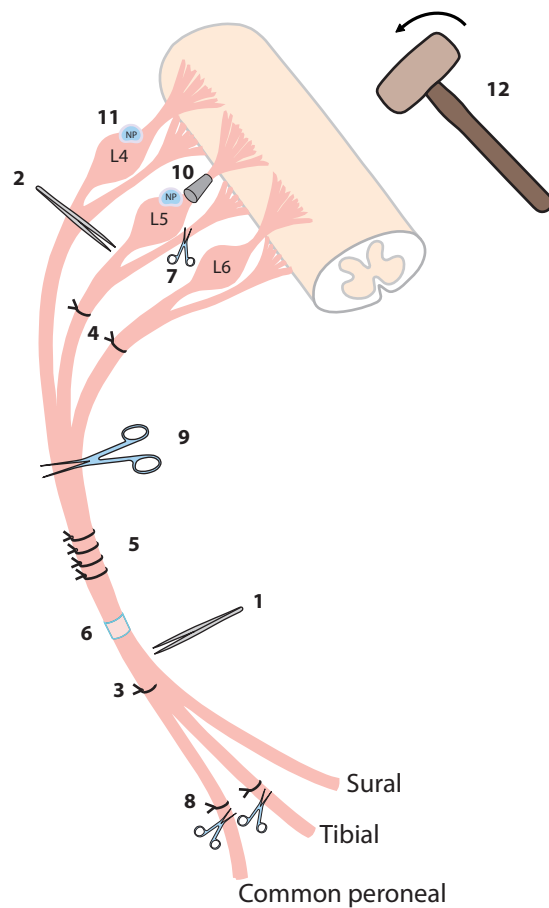


Figure C1. Schematic illustration of experimental traumatic models of neuropathic pain.

(1) Sciatic nerve crush injury (Bridge et al., 1994); (2) Spinal lumbar 5th nerve crush (Degn et al., 1999); (3) Partial sciatic nerve ligation (Seltzer et al., 1990); (4) Spinal nerve ligation (Kim and Chung, 1992); (5) Chronic constriction injury (Bennett and Xie, 1988); (6) Sciatic nerve cuffing (Mosconi and Kruger, 1996); (7) Lumbar 5th ventral root transection (Li et al., 2002); (8) Spared nerve injury (Decosterd and Woolf, 2000); (9) Sciatic nerve transection (Devor and Wall, 1981); (10) Chronic compression of the lumbar 5th ganglia (Hu and Xing, 1998); (11) Nucleus pulposus to the lumbar dorsal root (Yabuki et al., 2001) (12) Spinal cord injury (Behrmann et al., 1992).

published data are encouraging, we still need more clinical trials to evaluate the potential of these drugs for neuropathic pain relief.

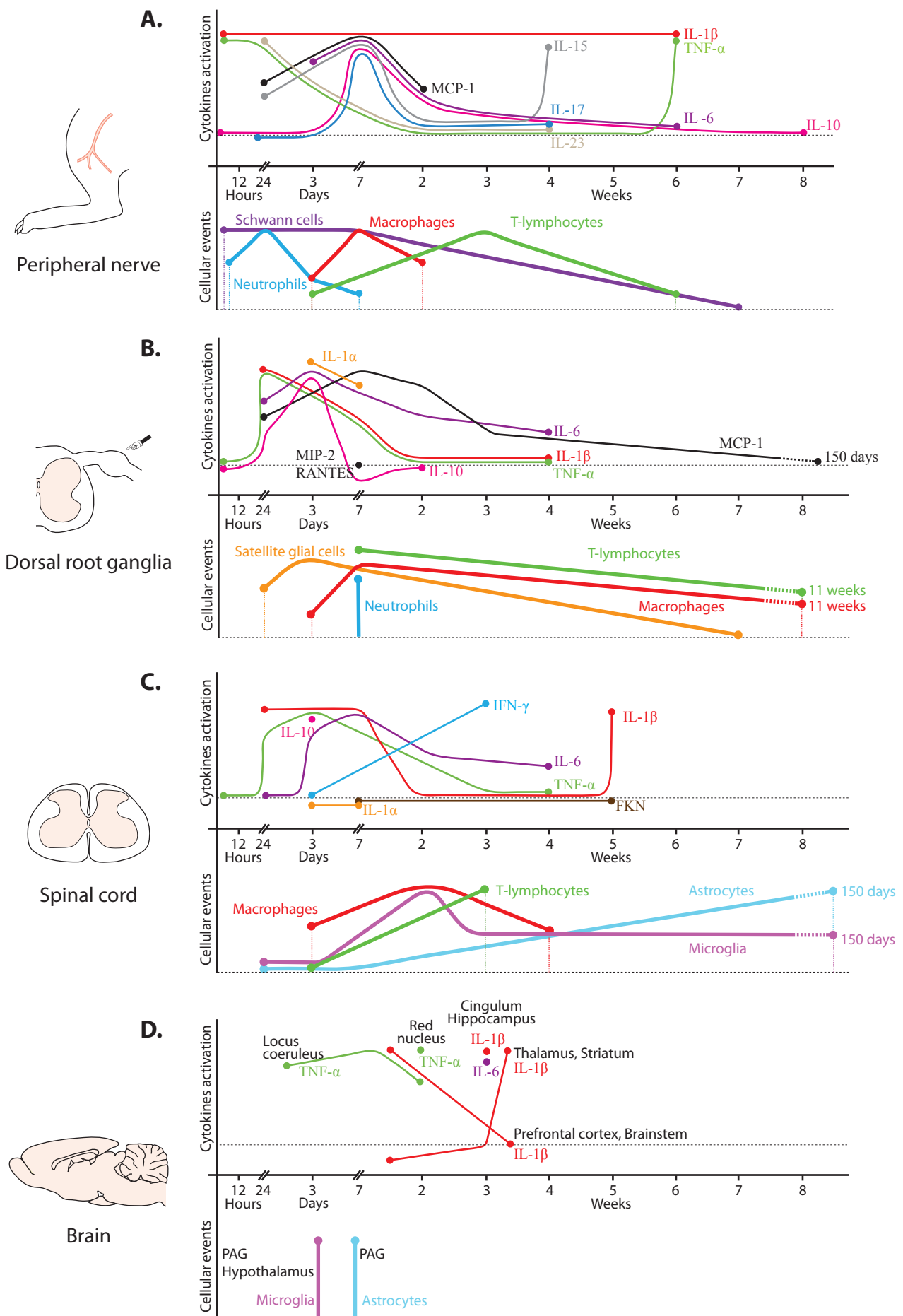
Cytokines as actors and targets in neuropathic pain: preclinical data

Animal models of neuropathic pain

Based on the clinical association between nervous system injuries and neuropathic pain, several animal models have been developed. Exhaustive presentations of these models are already available in the literature (Colleoni and Sacerdote, 2010; Jaggi *et al.*, 2011; Sorkin and Yaksh, 2009) and are not within the scope of this review. However, we will briefly present the few models for which cytokine-related information is available (**Figure C1**). Some models include pinching of nerve (crush), like sciatic nerve crush injury (Bridge *et al.*, 1994) or spinal lumbar 5th nerve crush (Degn *et al.*, 1999). Most models use chronic nerve compression, either by ligation, for example partial sciatic nerve ligation (PSNL) i.e. tight ligation of one-third to half of the sciatic nerve (Seltzer *et al.*, 1990), spinal nerve ligation (SNL) i.e. tight ligation of L5 and L6 spinal nerves, (Kim and Chung, 1992), chronic constriction injury (CCI, from which most data are available) consisting in four loose ligatures applied around the sciatic nerve (Bennett and Xie, 1988), or by implantation of a polyethylene cuff around the sciatic nerve (Mosconi and Kruger, 1996). Other models may imply axotomy, for example, the lumbar 5th ventral root transection (Li *et al.*, 2002), spared nerve injury (SNI) i.e. the axotomy of two of the three branches of the sciatic nerve (Decosterd and Woolf, 2000), or the complete transection of the sciatic nerve (Devor and Wall, 1981). Neuropathic pain was also induced by chronic compression of the lumbar 5th dorsal ganglion (CCD) (Hu and Xing, 1998), by application of nucleus pulposus to the lumbar nerve root just proximal to the dorsal root ganglia (Kawakami *et al.*, 1996), by cryoneurolysis i.e. local freezing of the sciatic nerve (DeLeo *et al.*, 1994), by infection model such as delivery of HIV-1 protein gp120 to sciatic nerve (Wallace *et al.*, 2007), or by neurotoxic drug exposure such as chemotherapy drugs (e.g., Vincristine) (Aley *et al.*, 1996). Central neuropathy was induced using spinal cord injury by dropping a weight over the exposed spinal cord (Behrmann *et al.*, 1992). Data related to cytokines in neuropathic pain were thus obtained from a wide variety of models. Despite this variety, converging information can be established.

Cytokines in neuropathic pain models

A number of experimental studies support the notion that pro-inflammatory cytokines may facilitate neuropathic pain. In animal models of peripheral nerve injuries, cytokine levels are rapidly and markedly upregulated in peripheral nerves, dorsal root ganglia, spinal cord and in certain regions of the brain. As neuropathic pain is a chronic and evolving condition, the question arises as to which inflammatory cytokines may be involved in the development and/or maintenance of pain states over time. After the induction of the neuropathy, a peak of microglia (Zhang and De Koninck, 2006) and/or macrophage (Hu and McLachlan, 2002) activation was observed after about 1 or 2 weeks. This microglial/macrophage



activation then decreases, even though it can remain significant after 3 weeks (Zhang and De Koninck, 2006). In contrast, astrocyte activation in the spinal cord develops from 2 weeks post-injury and persists for a longer period (Zhang and De Koninck, 2006). As these non-neuronal cells (macrophages, microglia, astrocytes) can be major sources of cytokines, we analysed literature data by considering cytokine expression during early events (up to 2 weeks post-surgery), which corresponds to the induction and the development of neuropathy, and during late events (after 2 weeks post-surgery), which may correspond to the maintenance of neuropathic pain. Unfortunately, less information is available concerning these late events.

Cytokines in induction and development of neuropathic pain: early events

Nerve lesion site. In the first post-surgery hours, an increase of mRNA production of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α or IL-1 β is present at the nerve lesion site (Sacerdote *et al.*, 2008; Uceyler *et al.*, 2007b). In fact, this pattern of expression can also be observed post-surgery in sham animals (Sacerdote *et al.*, 2008). On the first day of post-surgery, high levels of TNF- α or IL-1 β mRNAs are maintained at the nerve lesion site (Sacerdote *et al.*, 2008; Uceyler *et al.*, 2007b), and some other actors are detected such as IL-15, IL-23 (Kleinschnitz *et al.*, 2006) and the chemokine MCP-1 (Uceyler *et al.*, 2010). On the third day of post-surgery, an increase of mRNA expression of the pro-inflammatory cytokine IL-6 is also observed (Okamoto *et al.*, 2001). After one week post-surgery, IL-17 displayed a transient expression in neuropathic nerve (Kleinschnitz *et al.*, 2006; Noma *et al.*, 2011). In contrast, an increase of mRNA expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 was described (Sawada *et al.*, 2007), which may reflect opponent processes to the inflammation. One to two weeks post-surgery, IL-1 β , IL-6 and MCP-1 elevated expressions were maintained (Kleinschnitz *et al.*, 2006; Okamoto *et al.*, 2001). However, after two weeks, mRNA levels of TNF- α , IL-15, IL-17 and IL-23 returned to their baseline at the lesion site (George *et al.*, 1999; Kleinschnitz *et al.*, 2006; Sacerdote *et al.*, 2008; Sawada *et al.*, 2007). Within the injured nerve, it is important to consider that the mRNA levels and the protein levels of cytokines may sometimes correlate, as it is the case for IL-6 (Cui *et al.*, 2000; Okamoto *et al.*, 2001), but may also differ as it is the case for the TNF- α (George *et al.*, 2005; Okamoto *et al.*, 2001) or for IL-1 β (Cui *et al.*, 2000; Okamoto *et al.*, 2001).

In neuropathic animals, an activation of neutrophils peak at 24 hours post-injury (Perkins and Tracey, 2000), while an invasion of T-lymphocytes and an activation of Schwann cells start and remain present for several weeks (Campana, 2007; Moalem *et al.*, 2004). Interestingly, the maintained expression of MCP-1 mRNA was correlated with an increased anti-F4/80 staining in the nerve, reflecting tissue invasion by macrophages (Kleinschnitz *et al.*, 2006) (**Figure C2 A**).

Dorsal root ganglia. In the dorsal root ganglia, slight or no change in pro-inflammatory cytokines TNF- α or IL-1 β is observed during the first hours post-surgery (Uceyler *et al.*, 2007b). One day post-surgery, the first changes in cytokine expression appear with an observed increase in both TNF- α mRNA and protein levels (Lee *et al.*, 2004; Miao *et al.*, 2008; Sacerdote *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2004; Uceyler *et al.*

al., 2007b). Similarly, dorsal root ganglia levels of MCP-1 (Zhang and De Koninck, 2006), IL-1 β (Lee *et al.*, 2004) or IL-6 (Brazda *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2004), but also of the anti-inflammatory cytokine IL-10 (Jancalek *et al.*, 2010; Uceyler *et al.*, 2007b), increase. High expression of TNF- α (Sacerdote *et al.*, 2008), IL-1 β , IL-6 or IL-10 (Lee *et al.*, 2004; Mika *et al.*, 2008) are maintained for days, and another pro-inflammatory cytokine, IL-1 α , is also expressed. One to two weeks post-surgery, IL-10 expression decreases (Jancalek *et al.*, 2010), MCP-1 expression is maintained (Bhangoo *et al.*, 2009; Morin *et al.*, 2007) and no change is observed in the expression of the chemokines RANTES and MIP-2 (Morin *et al.*, 2007). TNF- α and IL-1 β expressions return to baseline after 2 weeks post-injury (Lee *et al.*, 2004; Miao *et al.*, 2008; Sacerdote *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2006). IL-6 overexpression also decreases, but it remains above baseline expression even after 2 weeks post-injury (Lee *et al.*, 2004; Valsecchi *et al.*, 2008).

With neuropathy, the satellite glial cells which are present around the dorsal root ganglion neurons are activated during several weeks (Xie *et al.*, 2009). A peak of neutrophil activation is observed a week after injury (Morin *et al.*, 2007), whereas macrophage (Hu *et al.*, 2007) or T-lymphocyte (Hu and McLachlan, 2002) activation was described from one week to two months after the induction of neuropathy (**Figure C2 B**).

Spinal cord. In the dorsal horn of the lumbar spinal cord, no change in pro-inflammatory cytokines is observed in the first hours following peripheral nerve injury (Sacerdote *et al.*, 2008). The day after surgery, increased expressions of TNF- α and IL-1 β are detected and remain present for a week before going down to basal levels at 2 weeks (Covey *et al.*, 2002; Detloff *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2004; Mika *et al.*, 2008; Ohtori *et al.*, 2004; Valsecchi *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2006). After 3 days, increased expressions of IL-10 and IL-6 are also observed (Lee *et al.*, 2004; Mika *et al.*, 2008). IL-6 mRNA overexpression is still present at 2 weeks (Lee *et al.*, 2004).

Macrophage invasion of the spinal cord is the only cellular change that is observed as early as 3 days post-injury (Zhang *et al.*, 2007). Interestingly, IFN- γ is up-regulated from the first week to the third week post-injury, and this pattern of expression correlates with T-lymphocyte infiltration (Costigan *et al.*, 2009). Moreover, microglial activation can be observed at one week, whereas astroglial activation appears only from two weeks post neuropathy. These glial activations continue for several months (Tanga *et al.*, 2004; Zhang and De Koninck, 2006) (**Figure C2 C**).

Brain. Nociceptive information processed through spinal cord networks are propagated to brain structures via pathways that will lead to the somatosensory, motivational, motor and emotional components of pain. Within these pathways, IL-1 β expression increases in the brainstem and the prefrontal cortex and decreases in the thalamus 10 days following peripheral nerve injury (Apkarian *et al.*, 2006). Supraspinal structures also exert an influence on spinal nociceptive processing through descending pathways. Within implicated structures, TNF- α expression increases in the locus cœruleus, a main noradrenergic centre, from two days to two weeks after surgery (Covey *et al.*, 2002). At three days and one week post-injury respectively, an up-regulation of microglial staining is observed in the periaqueductal grey and the hypothalamus (Takeda *et al.*, 2009), and an astroglial activation in the

periaqueductal grey (Mor *et al.*, 2010). However, there are few studies concerning changes in cytokine expression or glial cell activation of the brain in a neuropathic pain context (**Figure C2 D**).

Cytokines in maintenance of neuropathic pain: late events

While most studies focused on the early cytokine cascade during neuropathic pain development, some groups also investigated the potential role of cytokines in the maintenance of neuropathic pain.

Nerve lesion site. Locally, some cytokines such as the IL-1 β are consistently high during early events and their expression remains elevated even after a month post-surgery (Okamoto *et al.*, 2001; Valsecchi *et al.*, 2008). For others such as TNF- α or IL-15, expression levels return to normal 2 weeks post-surgery (George *et al.*, 2005; Kleinschnitz *et al.*, 2006; Sacerdote *et al.*, 2008; Sawada *et al.*, 2007) but increase again at later time-points (4-6 weeks) (Kleinschnitz *et al.*, 2006; Okamoto *et al.*, 2001), which may not be the case for IL-6 (Okamoto *et al.*, 2001), IL-17 or IL-23 (Kleinschnitz *et al.*, 2006). These data illustrate the complexity of the cytokine cascade during the course of the neuropathy, and they suggest that several waves of cytokine expression may accompany the development and maintenance of neuropathic pain (**Figure C2 A**).

Dorsal root ganglia. After increased expression of various cytokines during the first week post injury, a return to baseline for mRNA and protein levels is found from 2 weeks to 4 weeks for TNF- α and IL-1 β whereas IL-6 mRNA expression remains elevated (Lee *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2006). These findings were obtained after either chronic constriction injury of the sciatic nerve or sciatic nerve transection. However, increased TNF- α levels were still observed 3 weeks after spinal nerve ligation (Hatashita *et al.*, 2008), suggesting that late cytokine response may depend on the model. No information is available after 4 weeks. MCP-1 expression increases during the first 3 weeks post-surgery, slowly diminishing after four weeks until it returns to baseline at 5 months (Zhang and De Koninck, 2006) (**Figure C2 B**).

Spinal cord. At the lumbar level, TNF- α and IL-1 β levels are normal between 2 and 4 weeks after nerve injury (Lee *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2006), whereas increased IL-6 and IFN- γ are still observed (Costigan *et al.*, 2009; Detloff *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2004). No information is presently available at later time-points, except the cryoneurolysis model for which increased IL-1 β is present 5 weeks following nerve freezing (DeLeo *et al.*, 1997) (**Figure C2 C**).

Brain. Three weeks post-surgery, increased expression of IL-1 β was found in the thalamus, striatum, cingulum and hippocampus but not in the brainstem or prefrontal cortex (Al-Amin *et al.*, 2011; Apkarian *et al.*, 2006). Likewise, an increased expression of IL-6 was described in the cingulum and hippocampus, but not in the striatum (Al-Amin *et al.*, 2011) (**Figure C2 D**).

Even though some differences may be present between neuropathy models, an early increased expression of various proinflammatory cytokines is always observed in the peripheral and central nervous systems following peripheral nerve injury. This activation of cytokine expression is time- and tissue-dependent. It first occurs at the lesion site in the hours following the injury. Then this wave of

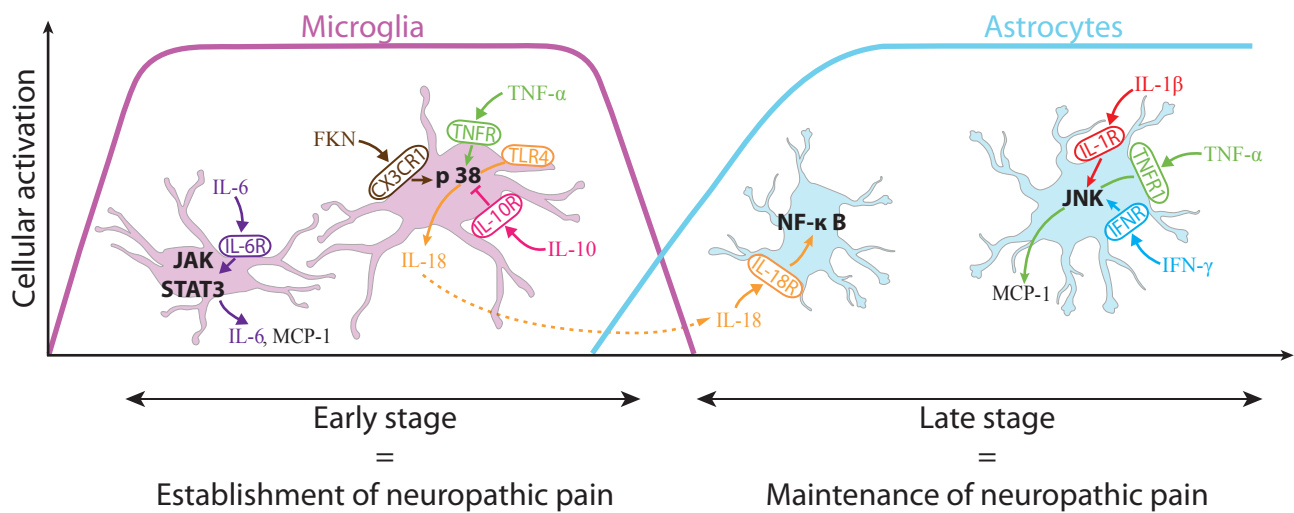


Figure C3. Spinal signalling pathways in the early or late stage of neuropathic pain.

Within the spinal cord, the p38 and the JAK/STAT3 pathways are preferentially activated in microglia by pro-inflammatory cytokines such as TNF-α or IL-6, while the JNK and NFκB pathways are also activated at later time points in astrocytes and act in the maintenance of neuropathic pain symptoms.

cytokine expression is transmitted to the dorsal root ganglia, then to the spinal cord and possibly supraspinal structures (Figure 2). Later on, with neuropathy maintenance, a different wave of cytokine expression may occur. It might (re)activate the expression of some cytokines such as TNF- α , but does not concern most of the other pro-inflammatory cytokines. Thus, this late expression may not be a classical pro-inflammatory cascade. Unfortunately, despite their translational relevance, few studies addressed these later events.

Transduction: Signalling pathway (Figure C3)

Following nerve injury, various informative substances such as cytokines are released by cells at the injured site. Cytokines exert their actions via their specific receptors and various downstream signalling pathways. Pathway recruitment may depend on the involved cytokines, cellular types and the receptors being present on both neuronal and non-neuronal cells. The same signalling pathways are often present both upstream of cytokine induction and downstream of cytokine receptors, thus participating in self-maintenance and/or amplification processes. For example, p38 Mitogen Activated Phosphorylated Kinase (MAPK) and Nuclear Factor-kappa B (NF- κ B) are recruited by TNF- α and IL-1 β (Zelenka *et al.*, 2005), and p38 positively regulates the biosynthesis of TNF- α and IL-1 β (Lee *et al.*, 1994; Widmann *et al.*, 1999). Most studies described cytokine/signalling pathways in the spinal cord, but some data are also available for the dorsal root ganglia.

TNF- α activates the p38 cascade *in vivo* to trigger neuropathic pain behaviour following spinal nerve ligation. In this model, phosphorylated p38 (p-p38) levels in the dorsal root ganglia and in the spinal cord are transiently elevated, which is blocked by TNF- α inhibition (Schäfers *et al.*, 2003c). Nerve injury elicits a strong increase of spinal phospho-p38 levels that selectively concerns microglia (Jin *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2002; Tsuda *et al.*, 2004). Furthermore, continuous infusion of the p38 inhibitor SB203580 delays allodynia development for up to 2 weeks after the initial spinal nerve injury (Jin *et al.*, 2003). In spinal microglia, peripheral neuropathy also induces an upregulation of CX3CR1, a chemokine fractalkine receptor. Intrathecal infusion of fractalkine is sufficient to produce marked p38 activation and mechanical allodynia (Zhuang *et al.*, 2007). Thus, cytokine-related p38 activation appears to have a key role in the microglial activation in the early events of neuropathy. It is worth noting that the anti-inflammatory cytokine IL-10 may negatively regulate this pathway and suppresses the production of inflammatory cytokines and p38 activation (Sawada *et al.*, 2007; Watkins *et al.*, 2003).

Another MAPK family member, c-Jun N-terminal Kinase (JNK), is also activated with nerve injury and could participate in neuropathic pain (Ma and Quirion, 2002). After nerve injury, JNK activation primarily occurs in small diameter C-fibre neurons (Obata *et al.*, 2004; Zhuang *et al.*, 2006). This transient activation is involved in the early development of mechanical allodynia, since infusion of the peptide JNK inhibitor D-JNKI-1 in dorsal root ganglia delays, but does not reverse, mechanical allodynia (Zhuang *et al.*, 2006). In contrast to this transient JNK activation in the dorsal root ganglia, a persistent activation of JNK is observed for more than 3 weeks in the spinal cord (Zhuang *et al.*, 2006), mainly

affecting astrocytes. Interestingly, the administration of a mix of cytokines containing TNF- α , IL-1 β and IFN- γ also induces a long lasting activation of JNK in astrocytes (Falsig *et al.*, 2004). In the spinal cord, neuropathy-induced TNF- α favours a strong production of MCP-1 by astrocytes through TNF- α receptor 1 (TNF- α R1), but not TNF- α R2, (Sommer *et al.*, 1998b) and also leads downstream activation of the JNK pathway (Gao *et al.*, 2009).

NF- κ B signalling may also be an important downstream mediator of cytokine action in neuropathic pain. In a situation of sciatic nerve injury, the TNF- α R1 is visible on satellite glial cells and sensory neurons in the dorsal root ganglia and on neurons and astrocytes in the spinal cord (Ohtori *et al.*, 2004). Peripheral nerve injury increases the expression of IL-6 and of TNF- α which binds to TNF- α R1 to activate the transcription factor NF- κ B in the dorsal root ganglia and in the spinal cord (Lee *et al.*, 2009). After spinal nerve injury, another cytokine, IL-18, is induced in microglia through a Toll-like receptor 4 (TLR4) - p38 MAPK pathway, and its receptor IL-18R is overexpressed in astrocytes (Miyoshi *et al.*, 2008). Blocking either IL-18 or its receptor by specific antibodies reduces the phosphorylation of NF- κ B in spinal astrocytes, the induction of astroglial markers, and the neuropathic allodynia (Miyoshi *et al.*, 2008). In the brain of neuropathic rats, an attenuation of both pro-inflammatory cytokine induction (IL-1 β , TNF- α or IL-6) and of NF- κ B hyperactivity can be observed after administration of erythropoietin (EPO) which acts as an anti-inflammatory cytokine (Jia *et al.*, 2009). While NF- κ B signalling is a downstream effector of cytokine action, it is also an upstream actor of cytokine induction. This dual implication may contribute to the self-induced maintenance of neuropathic pain. Following chronic constriction injury of the sciatic nerve, the gene and protein expression of MCP-1, CCR2 and CXCL10 in the nerve and of TNF- α , MCP-1, and CCR2 in the dorsal root ganglia are reduced in GFAP-I κ B α -dominant mice (Fu *et al.*, 2010). These animals are transgenic mice with NF- κ B inhibition in GFAP-expressing glial cells. Neuropathic behaviour was also attenuated in these GFAP-I κ B α -dominant mice (Fu *et al.*, 2010). Similarly, an I κ B α overproduction results in an inhibition of the NF- κ B pathway activated in spinal glial cells, and concomitantly prevents the enhanced expression of IL-6 and of iNOS and supports prolonged antihyperalgesic and antiallodynic effects following a chronic constriction injury (Meunier *et al.*, 2007).

The Janus kinase (JAK) / signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway is activated in spinal microglia as a consequence of peripheral nerve injury. This early activation of JAK/STAT3 is induced by IL-6 and participates in neuropathic pain development (Dominguez *et al.*, 2008), likely by contributing to the maintenance of cytokine expression. Indeed, blocking JAK/STAT3 activity prevents the abnormal spinal expression of IL-6 and MCP-1 after chronic constriction of the sciatic nerve and attenuates mechanical allodynia (Dominguez *et al.*, 2010).

While cytokine-related transduction pathways during neuropathic pain were mostly studied in the spinal cord, similar events are likely present in other structures of interest where cytokine recruitment was also observed (peripheral nerve, dorsal root ganglia or brain). This deserves future studies.

Other pathophysiological events

Various mechanisms known to be involved in neuropathic pain such as Wallerian degeneration, sympathetic sprouting or ectopic discharge could also be regulated by cytokines.

Wallerian degeneration, the self-destructive set of cellular and molecular processes by which degenerating axons and myelin are cleared after nerve injury, is initiated by macrophages and Schwann cells (Coleman and Freeman, 2010). It is a critical factor in the development of hyperalgesia in animal models of neuropathic pain. In a mouse strain with delayed Wallerian degeneration, C57BL/Wld mice, the time course of mechanical allodynia and thermal hyperalgesia are also delayed. Cytokines such as TNF- α , IL-1 α and IL-1 β , which are among the first produced at the injury site, may regulate macrophage recruitment, myelin removal and regeneration. This early production of TNF- α , IL-1 α , and IL-1 β is deficient in the C57BL/Wld mice (Shamash *et al.*, 2002; Sommer and Schafer, 1998).

Under physiological conditions, the afferent sensory nervous system and the efferent sympathetic nervous system are anatomically separated (Janig *et al.*, 1996). Following peripheral nerve injury, sympathetic efferent fibres may sprout into both the dorsal root ganglia and the spinal nerves, whereas in normal dorsal root ganglia sympathetic axons are only found accompanying blood vessels (Kummer *et al.*, 1990). Some cytokines are among the factors participating in the cascade of events leading to sympathetic sprouting. For example, the LIF is induced at the site of peripheral nerve injury (Kurek *et al.*, 1996), retrogradely transported by a subpopulation of sensory neurons and accumulated within the dorsal root ganglia (Curtis *et al.*, 1994; Thompson *et al.*, 1997). The intrathecal delivery of LIF results in sympathetic sprouting around dorsal root ganglion neurons in the absence of nerve injury (Thompson and Majithia, 1998). The cytokine IL-6 may also participate in sympathetic sprouting. IL-6 is not only produced in the injured nerve (Bolin *et al.*, 1995; Kurek *et al.*, 1996), but its mRNA is also upregulated in dorsal root ganglion sensory neurons following peripheral axotomy (Murphy *et al.*, 1995). The exogenous delivery of IL-6 produces sympathetic baskets of fibres around dorsal root ganglion neurons in intact animals (Thompson and Majithia, 1998), and basket formation is significantly impaired in IL-6 knockout mice after spinal nerve ligation (Ramer *et al.*, 1998).

The ectopic discharge hypothesis of neuropathic pain supposes that impulse activity generated ectopically in primary sensory neurons is a key driver of pain in neuropathy (Devor, 2009). After peripheral nerve injury, ectopic discharges of action potentials in primary afferents are associated with the abnormal expression of voltage gated sodium channels in dorsal root ganglion neurons. This overexpression of Nav1.3 and Nav1.8 channels in the dorsal root ganglia is suppressed by the inhibition of TNF- α synthesis by thalidomide (He *et al.*, 2010) or reduced in TNF- α R1 knockout mice (Chen *et al.*, 2011; He *et al.*, 2010). Acute topical application of TNF- α evokes action potentials and enhances neuronal excitability of dorsal root ganglion neurons, whether the dorsal root ganglion was or not previously exposed to compression injury. However, neurons from compressed dorsal root ganglion are more sensitive to TNF- α application than normal neurons (Liu *et al.*, 2002). Similarly, TNF- α superfusion of nerve-injured dorsal root ganglia *in vitro* elicits a prolonged high-frequency firing at

Treatments		Targets and mechanism	Data on neuropathic pain (*clinical data)	References
Blocking pro-inflammatory cytokine action				
Anti-TNF- α	Infliximab (Remicade®)	Inhibits TNF- α signalling	* Relieves lumbar radiculopathy (systemic)	Korhonen <i>et al.</i> , 2004, 2005
	Etanercept (Enbrel®)	Inhibits TNF- α signalling	* Relieves phantom limb pain (perineural) * Relieves chronic disc-related pain (perispinal) Reduces neuropathic pain symptoms (local or systemic)	Dahl <i>et al.</i> , 2008 Tobinick and Davoodifar, 2004 Kato <i>et al.</i> , 2009 ; Marchand <i>et al.</i> , 2009; Sommer <i>et al.</i> , 2001; Zanella <i>et al.</i> , 2008
Anti-IL-6 Anti-IL-1 β	Gene therapy: soluble TNF- α R1	Chelates released TNF- α	Reduces neuropathic pain symptoms (dorsal root ganglia)	Hao <i>et al.</i> , 2007
	Antibody against IL-6	Inhibits IL-6 signalling	Reduces mechanical allodynia (intrathecal)	Arruda <i>et al.</i> , 2000
	Antibody against IL-1 β	Inhibits IL-1 β signalling	Reduces neuropathic pain symptoms (intrathecal)	Kiguchi <i>et al.</i> , 2010a
	Combined anti-IL-1R / anti-TNF- α antibodies	Inhibits IL-1 β and TNF- α signalling	Reduces neuropathic pain symptoms (intrathecal)	Schäfers <i>et al.</i> , 2001
	Combined IL-1RA / soluble TNF- α receptors	Inhibits IL-1 β and TNF- α signalling	Reduces mechanical allodynia (intrathecal)	Sweitzer <i>et al.</i> , 2001
Blocking chemotactic cytokine action				
Anti-MIP-1 α	Antibody against MIP-1 α	Prevents macrophage and microglial activation	Prevents neuropathic pain symptoms (early intrathecal)	Kiguchi <i>et al.</i> , 2010
Anti-fractalkine (CX3CL1)	C3XCR1 neutralising antibody	Blocks fractalkine signalling and microglial activation	Delays neuropathic pain symptoms (early intrathecal)	Milligan <i>et al.</i> , 2004
Anti-MCP-1 (CCL2)	MCP-1 neutralising antibody	Blocks MCP-1 signalling and microglial activation	Reduces neuropathic pain symptoms (intrathecal)	Gao <i>et al.</i> , 2009; Thacker <i>et al.</i> , 2009
Using anti-inflammatory cytokines				
IL-2	Aldesleukin (Proleukin®), recombinant IL-2	Anti-inflammatory, neuroregulator	* Relief of post herpetic neuralgia (subcutaneous)	Rotty <i>et al.</i> , 2006
	Gene therapy: recombinant human IL-2		Reduces neuropathic allodynia (intrathecal)	Yao <i>et al.</i> , 2002
TGF- β 1	Rat recombinant TGF- β 1	Suppresses glial activation	Reduces neuropathic pain symptoms (intrathecal)	Echeverry e <i>et al.</i> , 2009
IL-10	Gene therapy: plasmid encoding IL-10	Suppresses proinflammatory cytokines	Reduces neuropathic allodynia (intrathecal)	Ledeboer <i>et al.</i> , 2007; Milligan <i>et al.</i> , 2006
IL-4	Gene therapy: expression of IL-4	Suppresses proinflammatory cytokines	Reduces neuropathic pain symptoms (peripheral)	Hao <i>et al.</i> , 2006
Erythropoietin	Recombinant human erythropoietin	Reduces Schwann cell-derived TNF- α	Reduces axonal degeneration and facilitates recovery from neuropathic pain (systemic)	Campana <i>et al.</i> , 2006
Blocking cytokine production by glial cells				
Glial inhibition	Propentofylline	Inhibits glial activation	Reduces neuropathic pain symptoms (systemic, intrathecal)	Sweitzer <i>et al.</i> , 2001b; Whitehead <i>et al.</i> , 2010
Microglial inhibition	Minocycline	Inhibits microglial activation	Prevents neuropathic symptoms (early systemic)	Latrémoière <i>et al.</i> , 2008; Mika <i>et al.</i> , 2009
Astroglial inhibition	L- α -aminoadipate	Astrocyte cytotoxin	Reduces neuropathic allodynia (late intrathecal)	Zhuang <i>et al.</i> , 2006
Blocking cytokine production by immune cells				
Immunomodulation	Methotrexate	Immunosuppressant agent	Reduces neuropathic allodynia (intrathecal)	Hashizume <i>et al.</i> , 2000
Blocking pro-inflammatory cytokine synthesis				
Cytokine synthesis inhibition	Pentoxifylline	Down-regulates cytokines synthesis	Reduces neuropathic pain symptoms (systemic)	Liu <i>et al.</i> , 2007; Mika <i>et al.</i> , 2009
	Thalidomide	Inhibits TNF- α production	Reduces neuropathic pain symptoms (systemic)	George <i>et al.</i> , 2000; Sommer <i>et al.</i> , 1998a
Immunomodulation	Glucocorticoids (high dose)	Inhibits cytokine synthesis	Reduces neuropathic pain symptoms (systemic, intrathecal)	Hayashi <i>et al.</i> , 2008 ; Li <i>et al.</i> , 2007; Xie <i>et al.</i> , 2006

Table C4. Cytokine-targeted treatments in neuropathic pain.

concentrations that are only marginally effective in naive dorsal root ganglia (Schäfers *et al.*, 2003a). Other cytokines play a similar role as the deletion of the IL-1 receptor type I or the transgenic overexpression of the IL-1 receptor antagonist reduces spontaneous ectopic activity following spinal nerve injury (Wolf *et al.*, 2006).

Behavioural aspects

Nociceptive consequences of cytokine induction with peripheral neuropathy have already been discussed in the above paragraphs: pro-inflammatory cytokines are pro-nociceptive while anti-inflammatory cytokines reverse pain behaviour.

The application of TNF- α onto dorsal root ganglia of rodents induces allodynia in naïve animals and enhances the allodynia and spontaneous pain behaviour in animals with peripheral neuropathy (Homma *et al.*, 2002; Schäfers *et al.*, 2003a). This suggests that TNF- α in dorsal root ganglia can be sufficient to induce allodynic conditions. Similarly, intrathecal infusion of IL-6 induces thermal hyperalgesia in nerve-injured rats and produces mechanical allodynia in naive rats (DeLeo *et al.*, 1996). IL-17 administration also induces mechanical allodynia and/or thermal hyperalgesia in naïve mice, depending on the site of administration (Kim and Moalem-Taylor, 2011). Reciprocally, neuropathy-related mechanical allodynia is reduced in TNF- α knockout mice (Yamashita *et al.*, 2008), IL-1 knockout mice (Honore *et al.*, 2006), IL-6 knockout mice (Kiguchi *et al.*, 2008) or IL-17 knockout mice (Kim and Moalem-Taylor, 2011).

Acute administration of the anti-inflammatory cytokine IL-10 suppresses the development of spinally-mediated pain facilitation in various models such as peripheral neuritis or spinal cord excitotoxic injury (Chacur *et al.*, 2004; Plunkett *et al.*, 2001).

Mice lacking the chemokine CCR2 receptor display normal nociceptive thresholds, but fail to develop mechanical allodynia in the partial sciatic injury model (Abbadie *et al.*, 2003). This suggests that chemokines, including MCP-1, also play key roles in the establishment of neuropathic pain.

These findings suggest a complex interactive network between various cytokines, and the fact that altering the action of one cytokine may be sufficient to alter the whole process leading to neuropathic pain.

Cytokine-targeted treatments

Data on the implication of cytokines in neuropathic pain suggest that these molecules may constitute interesting therapeutic targets. This potential is supported by a few clinical reports (Dahl and Cohen, 2008; Korhonen *et al.*, 2004; Korhonen *et al.*, 2005; Tobinick and Davoodifar, 2004) and by preclinical studies. There are various existing or potential strategies to inhibit the expression or the action of cytokines (**Table C4, Figure C4**). One possibility is to directly impair the action of pro-inflammatory cytokines by using antibodies or soluble receptors. Another possibility is to reduce pro-inflammatory

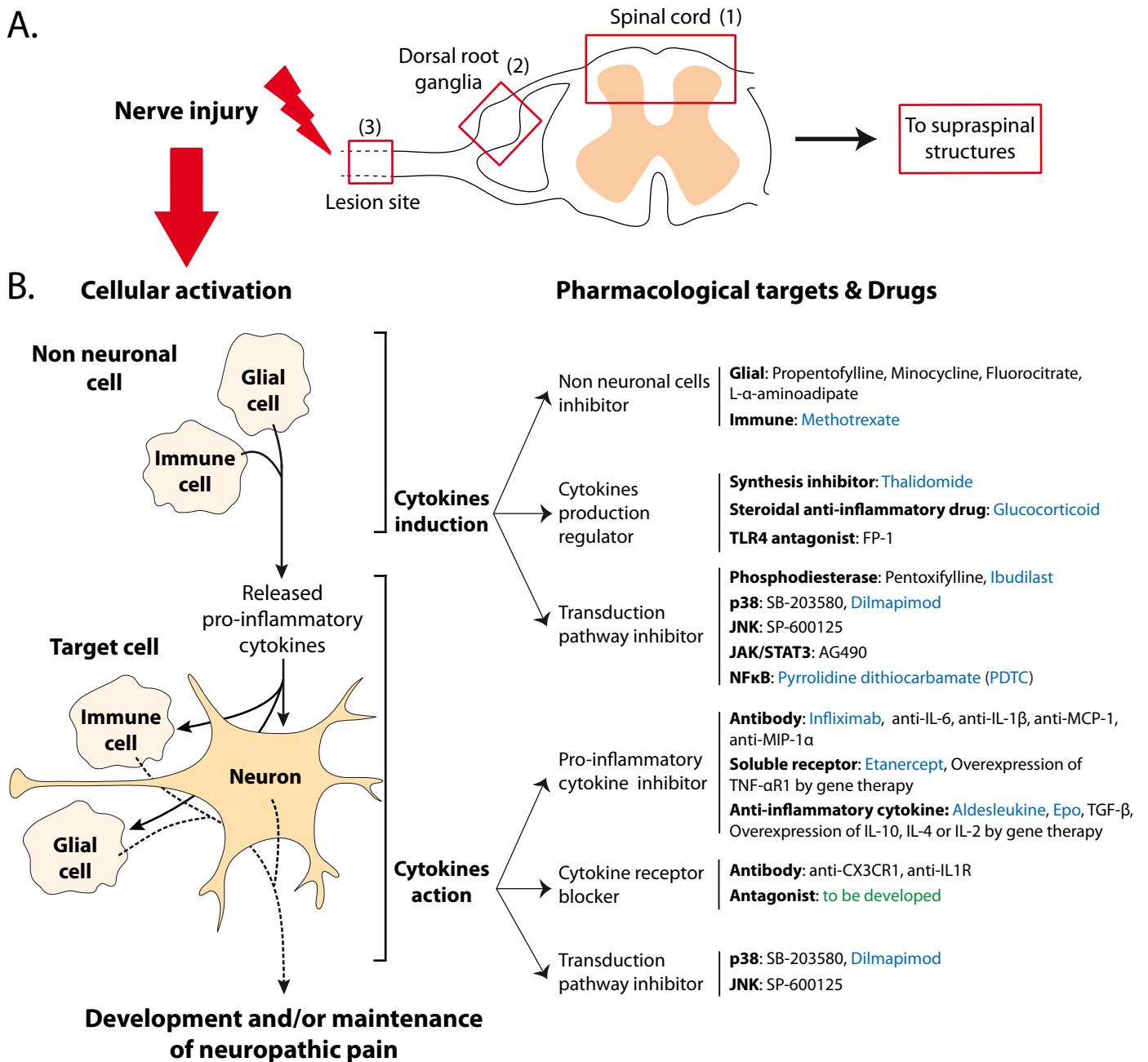


Figure C4. Schematic of the potential targets for manipulation of the cytokine system in neuropathic pain.

(A) Some clinical trials used anti-cytokine compounds for neuropathic pain management. However, the systemic intravenous or per os administration of these compounds can be associated with notable adverse effects. Depending on the considered neuropathic aetiology, a more localized delivery of treatments may overcome this limitation, which could be the case with intrathecal administrations affecting spinal cord and the nearby dorsal root ganglia, or with topical applications affecting peripheral nerves. (B) At molecular level, several possibilities exist for pharmacological manipulations of the cytokine system, either by targeting the induction of cytokines or by modulating their action. The cascades of cytokine induction by immune or glial non-neuronal cells can be targeted via intracellular transduction pathways, blockade of cellular activation or transcriptional control of cytokine expression. Cytokine action can be more directly targeted by using compounds capturing circulating cytokines or by acting on transduction pathways leading to cytokine effects, which pathways are often the same as the ones leading to cytokine expression. Pharmacological antagonists of cytokine receptors should also be of interest, but they are still to develop. (Light blue text refers to drugs already used or tested clinically, either for pain-related trials or for other pathological conditions)

cytokine expression, acting on molecular pathways leading to their synthesis, by using anti-inflammatory cytokines or by inhibiting immune or glial cells.

Targeting pro-inflammatory cytokine action. Preclinical studies have mainly focused on TNF- α (Leung and Cahill, 2010). Local or systemic administration of the TNF- α antagonist etanercept inhibits behavioural symptoms of neuropathic pain (Kato *et al.*, 2009; Marchand *et al.*, 2009; Sommer *et al.*, 2001; Zanella *et al.*, 2008). Local release of the soluble TNF R1, achieved by herpes simplex virus vector-based gene transfer to dorsal root ganglia, resulted in a reduction of membrane-associated TNF- α and concomitant reduction of mechanical allodynia and thermal hyperalgesia (Hao *et al.*, 2007). Moreover, the intrathecal injection of antibodies directed against other cytokines, IL-6 (Arruda *et al.*, 2000) or IL-1 β (Kiguchi *et al.*, 2010b), also attenuates the mechanical allodynia consecutive to peripheral nerve injury. Similarly, combined treatment with anti-IL-1 receptor and anti-TNF- α antibodies (Schäfers *et al.*, 2001) or combined treatments with soluble cytokine TNF- α receptor and IL-1 RA (Sweitzer *et al.*, 2001a) markedly reduces mechanical allodynia. These findings stress the potential interest of anti-cytokine strategies against neuropathic pain and are in agreement with the available clinical reports.

Targeting chemotactic cytokine action. Intrathecal recombinant MIP-1 α injection elicits long-lasting tactile allodynia and thermal hyperalgesia in naïve mice. Reciprocally, the intrathecal administration of a neutralizing antibody of MIP-1 α prevents the development of tactile allodynia and thermal hyperalgesia following nerve injury (Kiguchi *et al.*, 2010a). Similarly, intrathecal fractalkine infusion produces dose-dependent mechanical allodynia and thermal hyperalgesia, while a single injection of fractalkine receptor antagonist (neutralizing antibody against CX3CR1) delayed the development of mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in neuropathic pain models (Milligan *et al.*, 2004). Another chemokine, MCP-1, has also been preclinically targeted. Intrathecal injection of MCP-1 in naïve animals leads to activation of spinal microglia and neuropathic pain-like behaviour, and intrathecal administration of a selective neutralising antibody to MCP-1 inhibits microglial activation and neuropathic pain behaviour (Gao *et al.*, 2009; Thacker *et al.*, 2009). These results suggest that chemokines may be targets of interest to act on neuropathic pain symptoms.

Targeting anti-inflammatory cytokines. Intrathecal IL-2 or TGF- β_1 infusion as well as IL-10 or IL-4 gene therapy attenuate the expression of nerve injury-induced pro-inflammatory cytokines and attenuate mechanical allodynia (Echeverry *et al.*, 2009; Hao *et al.*, 2006; Ledebøer *et al.*, 2007; Milligan *et al.*, 2006; Yao *et al.*, 2002). The hematopoietic erythropoietin (EPO) can also act as an anti-inflammatory cytokine which can regulate TNF- α mRNA expression in Schwann cells and counteract TNF- α signalling leading to neuropathic pain (Campana *et al.*, 2006). These findings suggest that therapies based on anti-inflammatory cytokines could be of interest.

Targeting cytokine production by glial cells. Glial cells are a main source of cytokines, accompanying mechanical allodynia in neuropathic conditions. Sustained treatment with the xanthine derivative, propentofylline, reduces cytokine expression and normalizes nerve constriction-induced mechanical

hypersensitivity (Whitehead *et al.*, 2010) through inhibition of central glial activation (Sweitzer *et al.*, 2001b). The glial inhibition has been attributed to the phosphodiesterase inhibitor properties of propentofylline (Meskini *et al.*, 1994), but this molecule also has adenosine reuptake inhibitor properties. The action of propentofylline in neuropathic pain models is likely similar to what was also observed with another xanthine derivative, pentoxifylline (see *Blocking pro-inflammatory cytokine synthesis* below). Minocycline is an inhibitor of microglial inflammatory response in various neurodegenerative diseases, which exhibits a broad spectrum of anti-inflammatory actions by inhibiting molecules such as COX-2, iNOS, NADPH-oxidase, and P38 MAPK (Kim and Suh, 2009). In models of nerve injury, it attenuates cytokine expression and neuropathic symptoms (Latrémoière *et al.*, 2008; Mika *et al.*, 2009; Pabreja *et al.*, 2011; Padi and Kulkarni, 2008; Raghavendra *et al.*, 2003; Zanjani *et al.*, 2006). However, this therapeutic effect of minocycline requires prophylactic treatments, either pre-treatments or treatments within a week post-injury, since its effect is no longer present if treatments start at later time-points. Reciprocally, fluorocitrate, a reversible inhibitor of astrocyte function which acts by impairing the tricarboxylic acid cycle (Paulsen *et al.*, 1987), does not appear to have therapeutic effects if given at early time-points (Mika *et al.*, 2009). But the intrathecal administration of L- α -amino adipate, a cytotoxin relatively selective for astrocytes which interferes with astroglial metabolism by competitive inhibition of glutamine synthetase (McBean, 1994), can reverse nerve injury-induced mechanical allodynia at later time-points (Zhuang *et al.*, 2006). These data are in agreement with findings concerning the time-course of glial cell activation and involvement in neuropathic pain and suggest that this cell type dependent history should be taken into consideration for therapeutic strategies.

Targeting cytokine production by immune cells. Another source of cytokine production is the immune cells. During the first two weeks post-surgery, an immunosuppressive therapy with methotrexate reduces neuropathic allodynia (Hashizume *et al.*, 2000). Methotrexate is an immunosuppressant agent, which blocks the T lymphocyte proliferation by inhibiting the synthesis of purines and pyrimidines (Tian and Cronstein, 2007).

Targeting pro-inflammatory cytokine synthesis. Pentoxifylline, by its phosphodiesterase inhibitor action, is documented to possess immunomodulatory properties, including the down-regulation of cytokine synthesis such as TNF- α or IFN- γ (Doherty *et al.*, 1991; Heinkelein *et al.*, 1995). Thus, early systemic administration of pentoxifylline decreases the symptoms of neuropathic pain in animal models (Liu *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008; Mika *et al.*, 2009). In addition, another phosphodiesterase inhibitor, ibudilast, suppresses glial cell activation and attenuates pain symptoms in models of neuropathic pain (Ledeboer *et al.*, 2006). Thalidomide treatment decreases endoneurial production of TNF- α selectively, without affecting IL-1 β or IL-6 synthesis (George *et al.*, 2000), and has analgesic properties in neuropathic pain models (George *et al.*, 2000; Sommer *et al.*, 1998a). Early treatment with other immunomodulators such as glucocorticoids can also reduce endoneurial TNF- α expression and neuropathic allodynia at high doses (Hayashi *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2007). These high doses of glucocorticoids also inhibit the expression of other pro-inflammatory cytokines, such as IL-6, and reduce the sympathetic sprouting in

the dorsal root ganglia (Li *et al.*, 2007). After epidural injection at the time of nerve injury, the glucocorticoid betamethasone reduces neuropathic pain symptoms and decreases supraspinal TNF- α levels, IL-1 β levels and NF- κ B pathway activity, while promoting IL-10 expression (Xie *et al.*, 2006). These data support the interest of indirectly targeting cytokines synthesis, particularly at early points of neuropathic pain development.

Conclusions and perspectives

The cytokine system has a pivotal role in the neuro-immune-glia processes relevant to the genesis and maintenance of neuropathic pain both at peripheral and central levels.

From clinical and preclinical studies, there is growing evidence that the concept of an imbalance between algesic pro-inflammatory and analgesic anti-inflammatory cytokines, as was described for inflammatory pain, may somewhat be adapted to neuropathic pain. Moreover, some clinical and preclinical data support the potential therapeutic action of anticytokine treatments for neuropathic pain relief.

As it relates to preclinical research, a composite of rodent-based studies leads to a focus on the specificity of cell activations, expression patterns of different cytokines and signalling pathways in a time- and tissue-dependent manner. Such an analysis allows the demonstration of early and late events, corresponding to the development and maintenance of neuropathic pain, respectively. However, most information obtained from animal models mainly concerns the early stage, with a systematic description of the classical inflammatory cascade during the first days following the induction of the neuropathy. While it would potentially be of major clinical importance, the information concerning the late stage still remains limited. Reciprocally, most clinical data concern established neuropathic pain, while less information is available concerning early events. Clinical studies for early events and preclinical studies for late events are still necessary to correlate human and animal studies.

The induction and the action of cytokines appear as potential therapeutic targets for the clinical management of neuropathic pain. However, this therapeutic potential requires taking into account the time- and tissue-dependent cytokine expression, appropriate molecules to manipulate cytokine action, and the development of clinical trials to further explore anti-cytokine strategies in neuropathic pain management.

Acknowledgements

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, by the University of Strasbourg, and by Neurex.

References

- Abbadie, C, Lindia, JA, Cumiskey, AM, Peterson, LB, Mudgett, JS, Bayne, EK, DeMartino, JA, MacIntyre, DE, Forrest, MJ (2003) Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(13): 7947-7952.
- Abdulghani, J, El-Deiry, WS (2010) TRAIL receptor signaling and therapeutics. *Expert Opin Ther Targets* **14**(10): 1091-1108.
- Aderka, D (1996) The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **7**(3): 231-240.
- Al-Amin, H, Sarkis, R, Atweh, S, Jabbur, S, Saade, N (2011) Chronic dizocilpine or apomorphine and development of neuropathy in two animal models II: Effects on brain cytokines and neurotrophins. *Exp Neurol* **228**(1): 30-40.
- Aley, KO, Reichling, DB, Levine, JD (1996) Vincristine hyperalgesia in the rat: a model of painful vincristine neuropathy in humans. *Neuroscience* **73**(1): 259-265.
- Anand, P, Shenoy, R, Palmer, JE, Baines, AJ, Lai, RY, Robertson, J, Bird, N, Ostefeld, T, Chizh, BA (2011) Clinical trial of the p38 MAP kinase inhibitor diltapimod in neuropathic pain following nerve injury. *Eur J Pain*.
- Apkarian, A, Lavarello, S, Randolph, A, Berra, H, Chialvo, D, Besedovsky, H, del Rey, A (2006) Expression of IL-1 β in supraspinal brain regions in rats with neuropathic pain. *Neurosci Lett* **407**(2): 176-181.
- Arruda, JL, Sweitzer, S, Rutkowski, MD, DeLeo, JA (2000) Intrathecal anti-IL-6 antibody and IgG attenuates peripheral nerve injury-induced mechanical allodynia in the rat: possible immune modulation in neuropathic pain. *Brain Res* **879**(1-2): 216-225.
- Asensio, VC, Campbell, IL (1999) Chemokines in the CNS: plurifunctional mediators in diverse states. *Trends Neurosci* **22**(11): 504-512.
- Attal, N, Cruccu, G, Haanpaa, M, Hansson, P, Jensen, TS, Nurmikko, T, Sampaio, C, Sindrup, S, Wiffen, P (2006) EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain. *Eur J Neurol* **13**(11): 1153-1169.
- Attal, N, Fermanian, C, Fermanian, J, Lanteri-Minet, M, Alchaar, H, Bouhassira, D (2008) Neuropathic pain: are there distinct subtypes depending on the aetiology or anatomical lesion? *Pain* **138**(2): 343-353.
- Bagley, CJ, Woodcock, JM, Guthridge, MA, Stomski, FC, Lopez, AF (2001) Structural and functional hot spots in cytokine receptors. *Int J Hematol* **73**(3): 299-307.
- Barnes, PJ (2001) Cytokine modulators as novel therapies for airway disease. *Eur Respir J Suppl* **34**: 67s-77s.
- Barton, BE, Shortall, J, Jackson, JV (1996) Interleukins 6 and 11 protect mice from mortality in a staphylococcal enterotoxin-induced toxic shock model. *Infect Immun* **64**(3): 714-718.
- Behrmann, DL, Bresnahan, JC, Beattie, MS, Shah, BR (1992) Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats: behavioral and histologic analysis. *J Neurotrauma* **9**(3): 197-217.

- Benelli, R, Lorusso, G, Albini, A, Noonan, DM (2006) Cytokines and chemokines as regulators of angiogenesis in health and disease. *Curr Pharm Des* **12**(24): 3101-3115.
- Bennett, GJ, Xie, YK (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* **33**(1): 87-107.
- Bhangoo, SK, Ripsch, MS, Buchanan, DJ, Miller, RJ, White, FA (2009) Increased chemokine signaling in a model of HIV1-associated peripheral neuropathy. *Mol Pain* **5**: 48.
- Bolin, LM, Verity, AN, Silver, JE, Shooter, EM, Abrams, JS (1995) Interleukin-6 production by Schwann cells and induction in sciatic nerve injury. *J Neurochem* **64**(2): 850-858.
- Brazda, V, Klusakova, I, Svizenska, I, Veselkova, Z, Dubovy, P (2009) Bilateral changes in IL-6 protein, but not in its receptor gp130, in rat dorsal root ganglia following sciatic nerve ligature. *Cell Mol Neurobiol* **29**(6-7): 1053-1062.
- Bridge, PM, Ball, DJ, Mackinnon, SE, Nakao, Y, Brandt, K, Hunter, DA, Hertl, C (1994) Nerve crush injuries--a model for axonotmesis. *Exp Neurol* **127**(2): 284-290.
- Cameron, M, Kelvin, D (2000) *Cytokines, Chemokines and Their Receptors*. Landes Bioscience: Austin (TX).
- Campana, WM (2007) Schwann cells: activated peripheral glia and their role in neuropathic pain. *Brain Behav Immun* **21**(5): 522-527.
- Campana, WM, Li, X, Shubayev, VI, Angert, M, Cai, K, Myers, RR (2006) Erythropoietin reduces Schwann cell TNF-alpha, Wallerian degeneration and pain-related behaviors after peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci* **23**(3): 617-626.
- Chacur, M, Milligan, ED, Sloan, EM, Wieseler-Frank, J, Barrientos, RM, Martin, D, Poole, S, Lomonte, B, Gutierrez, JM, Maier, SF, Cury, Y, Watkins, LR (2004) Snake venom phospholipase A2s (Asp49 and Lys49) induce mechanical allodynia upon peri-sciatic administration: involvement of spinal cord glia, proinflammatory cytokines and nitric oxide. *Pain* **108**(1-2): 180-191.
- Chen, X, Pang, RP, Shen, KF, Zimmermann, M, Xin, WJ, Li, YY, Liu, XG (2011) TNF-alpha enhances the currents of voltage gated sodium channels in uninjured dorsal root ganglion neurons following motor nerve injury. *Exp Neurol* **227**(2): 279-286.
- Cohen, SP, Wenzell, D, Hurley, RW, Kurihara, C, Buckenmaier, CC, 3rd, Griffith, S, Larkin, TM, Dahl, E, Morlando, BJ (2007) A double-blind, placebo-controlled, dose-response pilot study evaluating intradiscal etanercept in patients with chronic discogenic low back pain or lumbosacral radiculopathy. *Anesthesiology* **107**(1): 99-105.
- Coleman, MP, Freeman, MR (2010) Wallerian degeneration, Wld^s, and Nmnat. *Annu Rev Neurosci* **33**: 245-267.
- Colleoni, M, Sacerdote, P (2010) Murine models of human neuropathic pain. *Biochim Biophys Acta* **1802**(10): 924-933.
- Colombo, B, Annovazzi, PO, Comi, G (2006) Medications for neuropathic pain: current trends. *Neurol Sci* **27 Suppl 2**: S183-189.

- Coluzzi, F, Mattia, C (2005) Mechanism-based treatment in chronic neuropathic pain: the role of antidepressants. *Curr Pharm Des* **11**(23): 2945-2960.
- Corwin, EJ (2000) Understanding cytokines. Part I: Physiology and mechanism of action. *Biol Res Nurs* **2**(1): 30-40.
- Costigan, M, Moss, A, Latremoliere, A, Johnston, C, Verma-Gandhu, M, Herbert, TA, Barrett, L, Brenner, GJ, Vardeh, D, Woolf, CJ, Fitzgerald, M (2009) T-cell infiltration and signaling in the adult dorsal spinal cord is a major contributor to neuropathic pain-like hypersensitivity. *J Neurosci* **29**(46): 14415-14422.
- Covey, W, Ignatowski, T, Renauld, A, Knight, P, Nader, N, Spengler, R (2002) Expression of neuron-associated TNF α in the brain is increased during persistent pain. *Reg Anesth Pain Med* **27**(4): 357-366.
- Crown, SE, Yu, Y, Sweeney, MD, Leary, JA, Handel, TM (2006) Heterodimerization of CCR2 chemokines and regulation by glycosaminoglycan binding. *J Biol Chem* **281**(35): 25438-25446.
- Cui, JG, Holmin, S, Mathiesen, T, Meyerson, BA, Linderth, B (2000) Possible role of inflammatory mediators in tactile hypersensitivity in rat models of mononeuropathy. *Pain* **88**(3): 239-248.
- Cunha, FQ, Poole, S, Lorenzetti, BB, Ferreira, SH (1992) The pivotal role of TNF α in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* **107**(3): 660-664.
- Cunha, FQ, Poole, S, Lorenzetti, BB, Veiga, FH, Ferreira, SH (1999) Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-4. *Br J Pharmacol* **126**(1): 45-50.
- Curtis, R, Scherer, SS, Somogyi, R, Adryan, KM, Ip, NY, Zhu, Y, Lindsay, RM, DiStefano, PS (1994) Retrograde axonal transport of LIF is increased by peripheral nerve injury: correlation with increased LIF expression in distal nerve. *Neuron* **12**(1): 191-204.
- Dahl, E, Cohen, SP (2008) Perineural injection of etanercept as a treatment for postamputation pain. *Clin J Pain* **24**(2): 172-175.
- Davies, A, Hayes, K, Dekaban, G (2007) Clinical correlates of elevated serum concentrations of cytokines and autoantibodies in patients with spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* **88**(11): 1384-1393.
- Decosterd, I, Woolf, CJ (2000) Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* **87**(2): 149-158.
- Degn, J, Tandrup, T, Jakobsen, J (1999) Effect of nerve crush on perikaryal number and volume of neurons in adult rat dorsal root ganglion. *J Comp Neurol* **412**(1): 186-192.
- DeLeo, JA, Colburn, RW, Nichols, M, Malhotra, A (1996) Interleukin-6-mediated hyperalgesia/allodynia and increased spinal IL-6 expression in a rat mononeuropathy model. *J Interferon Cytokine Res* **16**(9): 695-700.
- DeLeo, JA, Colburn, RW, Rickman, AJ (1997) Cytokine and growth factor immunohistochemical spinal profiles in two animal models of mononeuropathy. *Brain Res* **759**(1): 50-57.
- DeLeo, JA, Coombs, DW, Willenbring, S, Colburn, RW, Fromm, C, Wagner, R, Twitchell, BB (1994) Characterization of a neuropathic pain model: sciatic cryoneurolysis in the rat. *Pain* **56**(1): 9-16.

Detloff, MR, Fisher, LC, McGaughy, V, Longbrake, EE, Popovich, PG, Basso, DM (2008) Remote activation of microglia and pro-inflammatory cytokines predict the onset and severity of below-level neuropathic pain after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* **212**(2): 337-347.

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

Devor, M, Wall, PD (1981) Plasticity in the spinal cord sensory map following peripheral nerve injury in rats. *J Neurosci* **1**(7): 679-684.

Doherty, GM, Jensen, JC, Alexander, HR, Buresh, CM, Norton, JA (1991) Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. *Surgery* **110**(2): 192-198.

Dominguez, E, Mauborgne, A, Mallet, J, Desclaux, M, Pohl, M (2010) SOCS3-mediated blockade of JAK/STAT3 signaling pathway reveals its major contribution to spinal cord neuroinflammation and mechanical allodynia after peripheral nerve injury. *J Neurosci* **30**(16): 5754-5766.

Dominguez, E, Rivat, C, Pommier, B, Mauborgne, A, Pohl, M (2008) JAK/STAT3 pathway is activated in spinal cord microglia after peripheral nerve injury and contributes to neuropathic pain development in rat. *J Neurochem* **107**(1): 50-60.

Doupis, J, Lyons, TE, Wu, S, Gnardellis, C, Dinh, T, Veves, A (2009) Microvascular reactivity and inflammatory cytokines in painful and painless peripheral diabetic neuropathy. *J Clin Endocrinol Metab* **94**(6): 2157-2163.

Echeverry, S, Shi, XQ, Haw, A, Liu, H, Zhang, ZW, Zhang, J (2009) Transforming growth factor-beta1 impairs neuropathic pain through pleiotropic effects. *Mol Pain* **5**: 16.

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

Falsig, J, Porzgen, P, Lotharius, J, Leist, M (2004) Specific modulation of astrocyte inflammation by inhibition of mixed lineage kinases with CEP-1347. *J Immunol* **173**(4): 2762-2770.

Feldmann, M, Maini, SR (2008) Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics. *Immunol Rev* **223**: 7-19.

Ferreira, SH, Lorenzetti, BB, Bristow, AF, Poole, S (1988) Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature* **334**(6184): 698-700.

Fitzgerald, KA, Palsson-McDermott, EM, Bowie, AG, Jefferies, CA, Mansell, AS, Brady, G, Brint, E, Dunne, A, Gray, P, Harte, MT, McMurray, D, Smith, DE, Sims, JE, Bird, TA, O'Neill, LA (2001) Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* **413**(6851): 78-83.

Fu, ES, Zhang, YP, Sagen, J, Candiotti, KA, Morton, PD, Liebl, DJ, Bethea, JR, Brambilla, R (2010) Transgenic inhibition of glial NF-kappa B reduces pain behavior and inflammation after peripheral nerve injury. *Pain* **148**(3): 509-518.

Gao, YJ, Zhang, L, Samad, OA, Suter, MR, Yasuhiko, K, Xu, ZZ, Park, JY, Lind, AL, Ma, Q, Ji, RR (2009) JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain. *J Neurosci* **29**(13): 4096-4108.

Garbay, B, Heape, AM, Sargueil, F, Cassagne, C (2000) Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* **61**(3): 267-304.

George, A, Buehl, A, Sommer, C (2005) TNF receptor 1 and 2 proteins are differentially regulated during Wallerian degeneration of mouse sciatic nerve. *Exp Neurol* **192**(1): 163-166.

George, A, Marziniak, M, Schafers, M, Toyka, KV, Sommer, C (2000) Thalidomide treatment in chronic constrictive neuropathy decreases endoneurial tumor necrosis factor-alpha, increases interleukin-10 and has long-term effects on spinal cord dorsal horn met-enkephalin. *Pain* **88**(3): 267-275.

George, A, Schmidt, C, Weishaupt, A, Toyka, KV, Sommer, C (1999) Serial determination of TNF-alpha content in rat sciatic nerve after chronic constriction injury. *Exp Neurol* **160**(1): 124-132.

Gilron, I, Watson, CP, Cahill, CM, Moulin, DE (2006) Neuropathic pain: a practical guide for the clinician. *CMAJ* **175**(3): 265-275.

Hao, S, Mata, M, Glorioso, JC, Fink, DJ (2007) Gene transfer to interfere with TNFalpha signaling in neuropathic pain. *Gene Ther* **14**(13): 1010-1016.

Hao, S, Mata, M, Glorioso, JC, Fink, DJ (2006) HSV-mediated expression of interleukin-4 in dorsal root ganglion neurons reduces neuropathic pain. *Mol Pain* **2**: 6.

Hashizume, H, Rutkowski, MD, Weinstein, JN, DeLeo, JA (2000) Central administration of methotrexate reduces mechanical allodynia in an animal model of radiculopathy/sciatica. *Pain* **87**(2): 159-169.

Hatashita, S, Sekiguchi, M, Kobayashi, H, Konno, S, Kikuchi, S (2008) Contralateral neuropathic pain and neuropathology in dorsal root ganglion and spinal cord following hemilateral nerve injury in rats. *Spine (Phila Pa 1976)* **33**(12): 1344-1351.

Hayashi, R, Xiao, W, Kawamoto, M, Yuge, O, Bennett, GJ (2008) Systemic glucocorticoid therapy reduces pain and the number of endoneurial TNFalpha-positive mast cells in rats with a painful peripheral neuropathy. *J Pharmacol Sci* **106**(4): 559-565.

He, XH, Zang, Y, Chen, X, Pang, RP, Xu, JT, Zhou, X, Wei, XH, Li, YY, Xin, WJ, Qin, ZH, Liu, XG (2010) TNF-alpha contributes to up-regulation of Nav1.3 and Nav1.8 in DRG neurons following motor fiber injury. *Pain* **151**(2): 266-279.

Heinkelein, M, Schneider-Schaulies, J, Walker, BD, Jassoy, C (1995) Inhibition of cytotoxicity and cytokine release of CD8+ HIV-specific cytotoxic T lymphocytes by pentoxifylline. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **10**(4): 417-424.

Held, TK, Gundert-Remy, U (2009) Pharmacodynamic effects of haematopoietic cytokines: the view of a clinical oncologist. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **106**(3): 210-214.

Hempenstall, K, Nurmikko, TJ, Johnson, RW, A'Hern, RP, Rice, AS (2005) Analgesic therapy in postherpetic neuralgia: a quantitative systematic review. *PLoS Med* **2**(7): e164.

Homma, Y, Brull, SJ, Zhang, JM (2002) A comparison of chronic pain behavior following local application of TNFalpha to the normal and mechanically compressed lumbar ganglia in the rat. *Pain* **95**(3): 239-246.

Honore, P, Wade, CL, Zhong, C, Harris, RR, Wu, C, Ghayur, T, Iwakura, Y, Decker, MW, Faltynek, C, Sullivan, J, Jarvis, M (2006) IL-1 α gene-deficient mice show reduced nociceptive sensitivity in models of inflammatory and neuropathic pain but not post-operative pain. *Behav Brain Res* **167**(2): 355-364.

Hu, P, Bembrick, AL, Keay, KA, McLachlan, EM (2007) Immune cell involvement in dorsal root ganglia and spinal cord after chronic constriction or transection of the rat sciatic nerve. *Brain Behav Immun* **21**(5): 599-616.

Hu, P, McLachlan, EM (2002) Macrophage and lymphocyte invasion of dorsal root ganglia after peripheral nerve lesions in the rat. *Neuroscience* **112**(1): 23-38.

Hu, SJ, Xing, JL (1998) An experimental model for chronic compression of dorsal root ganglion produced by intervertebral foramen stenosis in the rat. *Pain* **77**(1): 15-23.

Ingman, WV, Jones, RL (2008) Cytokine knockouts in reproduction: the use of gene ablation to dissect roles of cytokines in reproductive biology. *Hum Reprod Update* **14**(2): 179-192.

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

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

Janig, W, Levine, JD, Michaelis, M (1996) Interactions of sympathetic and primary afferent neurons following nerve injury and tissue trauma. *Prog Brain Res* **113**: 161-184.

Jeanjean, AP, Moussaoui, SM, Maloteaux, JM, Laduron, PM (1995) Interleukin-1 beta induces long-term increase of axonally transported opiate receptors and substance P. *Neuroscience* **68**(1): 151-157.

Jia, HB, Jin, Y, Ji, Q, Hu, YF, Zhou, ZQ, Xu, JG, Yang, JJ (2009) Effects of recombinant human erythropoietin on neuropathic pain and cerebral expressions of cytokines and NF- κ B. *Can J Anaesth* **56**(8): 597-603.

Jiang, CL, Xu, D, Lu, CL, Wang, YX, You, ZD, Liu, XY (2000) Interleukin-2: structural and biological relatedness to opioid peptides. *Neuroimmunomodulation* **8**(1): 20-24.

Jin, SX, Zhuang, ZY, Woolf, CJ, Ji, RR (2003) p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. *J Neurosci* **23**(10): 4017-4022.

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

Kato, K, Kikuchi, S, Shubayev, VI, Myers, RR (2009) Distribution and tumor necrosis factor-alpha isoform binding specificity of locally administered etanercept into injured and uninjured rat sciatic nerve. *Neuroscience* **160**(2): 492-500.

Kawakami, M, Tamaki, T, Weinstein, JN, Hashizume, H, Nishi, H, Meller, ST (1996) Pathomechanism of pain-related behavior produced by allografts of intervertebral disc in the rat. *Spine (Phila Pa 1976)* **21**(18): 2101-2107.

- Kiguchi, N, Kobayashi, Y, Maeda, T, Saika, F, Kishioka, S (2010a) CC-chemokine MIP-1alpha in the spinal cord contributes to nerve injury-induced neuropathic pain. *Neurosci Lett* **484**(1): 17-21.
- Kiguchi, N, Maeda, T, Kobayashi, Y, Fukazawa, Y, Kishioka, S (2010b) Macrophage inflammatory protein-1alpha mediates the development of neuropathic pain following peripheral nerve injury through interleukin-1beta up-regulation. *Pain* **149**(2): 305-315.
- Kiguchi, N, Maeda, T, Kobayashi, Y, Kondo, T, Ozaki, M, Kishioka, S (2008) The critical role of invading peripheral macrophage-derived interleukin-6 in vincristine-induced mechanical allodynia in mice. *Eur J Pharmacol* **592**(1-3): 87-92.
- Kim, CF, Moalem-Taylor, G (2011) Interleukin-17 contributes to neuroinflammation and neuropathic pain following peripheral nerve injury in mice. *J Pain* **12**(3): 370-383.
- Kim, HS, Suh, YH (2009) Minocycline and neurodegenerative diseases. *Behav Brain Res* **196**(2): 168-179.
- Kim, SH, Chung, JM (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* **50**(3): 355-363.
- Kim, SY, Bae, JC, Kim, JY, Lee, HL, Lee, KM, Kim, DS, Cho, HJ (2002) Activation of p38 MAP kinase in the rat dorsal root ganglia and spinal cord following peripheral inflammation and nerve injury. *Neuroreport* **13**(18): 2483-2486.
- Kingsley, DM (1994) The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* **8**(2): 133-146.
- Klein, MA, Moller, JC, Jones, LL, Bluethmann, H, Kreutzberg, GW, Raivich, G (1997) Impaired neuroglial activation in interleukin-6 deficient mice. *Glia* **19**(3): 227-233.
- Kleinschnitz, C, Hofstetter, HH, Meuth, SG, Braeuninger, S, Sommer, C, Stoll, G (2006) T cell infiltration after chronic constriction injury of mouse sciatic nerve is associated with IL-17 expression. *Exp Neurol* **200**(2): 480-485.
- Korhonen, T, Karppinen, J, Malmivaara, A, Autio, R, Niinimäki, J, Paimela, L, Kyllönen, E, Lindgren, KA, Tervonen, O, Seitsalo, S, Hurri, H (2004) Efficacy of infliximab for disc herniation-induced sciatica: one-year follow-up. *Spine (Phila Pa 1976)* **29**(19): 2115-2119.
- Korhonen, T, Karppinen, J, Paimela, L, Malmivaara, A, Lindgren, KA, Jarvinen, S, Niinimäki, J, Veeger, N, Seitsalo, S, Hurri, H (2005) The treatment of disc herniation-induced sciatica with infliximab: results of a randomized, controlled, 3-month follow-up study. *Spine (Phila Pa 1976)* **30**(24): 2724-2728.
- Kotani, N, Kudo, R, Sakurai, Y, Sawamura, D, Sessler, DI, Okada, H, Nakayama, H, Yamagata, T, Yasujima, M, Matsuki, A (2004) Cerebrospinal fluid interleukin 8 concentrations and the subsequent development of postherpetic neuralgia. *Am J Med* **116**(5): 318-324.
- Kraychete, DC, Sakata, RK, Issy, AM, Bacellar, O, Jesus, RS, Carvalho, EM (2009) Proinflammatory cytokines in patients with neuropathic pain treated with Tramadol. *Rev Bras Anesthesiol* **59**(3): 297-303.
- Kummer, W, Gibbins, IL, Stefan, P, Kapoor, V (1990) Catecholamines and catecholamine-synthesizing enzymes in guinea-pig sensory ganglia. *Cell Tissue Res* **261**(3): 595-606.

Kurek, JB, Austin, L, Cheema, SS, Bartlett, PF, Murphy, M (1996) Up-regulation of leukaemia inhibitory factor and interleukin-6 in transected sciatic nerve and muscle following denervation. *Neuromuscul Disord* **6**(2): 105-114.

Kwon, BK, Stammers, AM, Belanger, LM, Bernardo, A, Chan, D, Bishop, CM, Slobogean, GP, Zhang, H, Umedaly, H, Giffin, M, Street, J, Boyd, MC, Paquette, SJ, Fisher, CG, Dvorak, MF (2010) Cerebrospinal fluid inflammatory cytokines and biomarkers of injury severity in acute human spinal cord injury. *J Neurotrauma* **27**(4): 669-682.

Larrubia, JR, Benito-Martinez, S, Miquel-Plaza, J, Sanz-de-Villalobos, E, Gonzalez-Mateos, F, Parra, T (2009) Cytokines - their pathogenic and therapeutic role in chronic viral hepatitis. *Rev Esp Enferm Dig* **101**(5): 343-351.

Latrémolière, A, Mauborgne, A, Masson, J, Bourgoin, S, Kayser, V, Hamon, M, Pohl, M (2008) Differential implication of proinflammatory cytokine interleukin-6 in the development of cephalic versus extracephalic neuropathic pain in rats. *J Neurosci* **28**(34): 8489-8501.

Ledeboer, A, Jekich, BM, Sloane, EM, Mahoney, JH, Langer, SJ, Milligan, ED, Martin, D, Maier, SF, Johnson, KW, Leinwand, LA, Chavez, RA, Watkins, LR (2007) Intrathecal interleukin-10 gene therapy attenuates paclitaxel-induced mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in dorsal root ganglia in rats. *Brain Behav Immun* **21**(5): 686-698.

Ledeboer, A, Liu, T, Shumilla, JA, Mahoney, JH, Vijay, S, Gross, MI, Vargas, JA, Sultzbaugh, L, Claypool, MD, Sanftner, LM, Watkins, LR, Johnson, KW (2006) The glial modulatory drug AV411 attenuates mechanical allodynia in rat models of neuropathic pain. *Neuron Glia Biol* **2**(4): 279-291.

Lee, HL, Lee, KM, Son, SJ, Hwang, SH, Cho, HJ (2004) Temporal expression of cytokines and their receptors mRNAs in a neuropathic pain model. *Neuroreport* **15**(18): 2807-2811.

Lee, JC, Laydon, JT, McDonnell, PC, Gallagher, TF, Kumar, S, Green, D, McNulty, D, Blumenthal, MJ, Heys, JR, Landvatter, SW, et al. (1994) A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* **372**(6508): 739-746.

Lee, KM, Jeon, SM, Cho, HJ (2009) Tumor necrosis factor receptor 1 induces interleukin-6 upregulation through NF-kappaB in a rat neuropathic pain model. *Eur J Pain* **13**(8): 794-806.

Leonard, WJ, Imada, K, Nakajima, H, Puel, A, Soldaini, E, John, S (1999) Signaling via the IL-2 and IL-7 receptors from the membrane to the nucleus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **64**: 417-424.

Leung, L, Cahill, CM (2010) TNF-alpha and neuropathic pain--a review. *J Neuroinflammation* **7**: 27.

Li, H, Xie, W, Strong, JA, Zhang, JM (2007) Systemic antiinflammatory corticosteroid reduces mechanical pain behavior, sympathetic sprouting, and elevation of proinflammatory cytokines in a rat model of neuropathic pain. *Anesthesiology* **107**(3): 469-477.

Li, L, Xian, CJ, Zhong, JH, Zhou, XF (2002) Effect of lumbar 5 ventral root transection on pain behaviors: a novel rat model for neuropathic pain without axotomy of primary sensory neurons. *Exp Neurol* **175**(1): 23-34.

- Lindenlaub, T, Sommer, C (2003) Cytokines in sural nerve biopsies from inflammatory and non-inflammatory neuropathies. *Acta Neuropathol* **105**(6): 593-602.
- Liu, B, Li, H, Brull, SJ, Zhang, JM (2002) Increased sensitivity of sensory neurons to tumor necrosis factor alpha in rats with chronic compression of the lumbar ganglia. *J Neurophysiol* **88**(3): 1393-1399.
- Liu, J, Feng, X, Yu, M, Xie, W, Zhao, X, Li, W, Guan, R, Xu, J (2007) Pentoxifylline attenuates the development of hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett* **412**(3): 268-272.
- Liu, J, Li, W, Zhu, J, Zhang, J, Feng, X, Guan, R, Xu, J (2008) The effect of pentoxifylline on existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *Anesth Analg* **106**(2): 650-653, table of contents.
- Loeser, JD, Treede, RD (2008) The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain* **137**(3): 473-477.
- Ludwig, J, Binder, A, Steinmann, J, Wasner, G, Baron, R (2008) Cytokine expression in serum and cerebrospinal fluid in non-inflammatory polyneuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **79**(11): 1268-1273.
- Ma, W, Quirion, R (2002) Partial sciatic nerve ligation induces increase in the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) in astrocytes in the lumbar spinal dorsal horn and the gracile nucleus. *Pain* **99**(1-2): 175-184.
- MacEwan, DJ (2002) TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal* **14**(6): 477-492.
- Madhusudan, S, Muthuramalingam, SR, Braybrooke, JP, Wilner, S, Kaur, K, Han, C, Hoare, S, Balkwill, F, Ganesan, TS (2005) Study of etanercept, a tumor necrosis factor-alpha inhibitor, in recurrent ovarian cancer. *J Clin Oncol* **23**(25): 5950-5959.
- Maier, SF, Wiertelak, EP, Martin, D, Watkins, LR (1993) Interleukin-1 mediates the behavioral hyperalgesia produced by lithium chloride and endotoxin. *Brain Res* **623**(2): 321-324.
- Marchand, F, Tsantoulas, C, Singh, D, Grist, J, Clark, AK, Bradbury, EJ, McMahon, SB (2009) Effects of Etanercept and Minocycline in a rat model of spinal cord injury. *Eur J Pain* **13**(7): 673-681.
- McBean, GJ (1994) Inhibition of the glutamate transporter and glial enzymes in rat striatum by the gliotoxin, alpha aminoadipate. *Br J Pharmacol* **113**(2): 536-540.
- Meskini, N, Nemoz, G, Okyayuz-Baklouti, I, Lagarde, M, Prigent, AF (1994) Phosphodiesterase inhibitory profile of some related xanthine derivatives pharmacologically active on the peripheral microcirculation. *Biochem Pharmacol* **47**(5): 781-788.
- Meunier, A, Latremoliere, A, Dominguez, E, Mauborgne, A, Philippe, S, Hamon, M, Mallet, J, Benoliel, JJ, Pohl, M (2007) Lentiviral-mediated targeted NF-kappaB blockade in dorsal spinal cord glia attenuates sciatic nerve injury-induced neuropathic pain in the rat. *Mol Ther* **15**(4): 687-697.
- Miao, P, Madec, K, Gong, Y, Shen, H, Eisenstat, D, Melanson, M, Gu, X, Leong, C, Klowak, M, Namaka, M (2008) Axotomy-induced up-regulation of tumor necrosis factor-alpha in the dorsal root ganglia. *Neurol Res* **30**(6): 623-631.

- Mico, JA, Ardid, D, Berrocso, E, Eschaliere, A (2006) Antidepressants and pain. *Trends Pharmacol Sci* **27**(7): 348-354.
- Mika, J, Korostynski, M, Kaminska, D, Wawrzczak-Bargiela, A, Osikowicz, M, Makuch, W, Przewlocki, R, Przewlocka, B (2008) Interleukin-1 alpha has antiallodynic and antihyperalgesic activities in a rat neuropathic pain model. *Pain* **138**(3): 587-597.
- Mika, J, Osikowicz, M, Rojewska, E, Korostynski, M, Wawrzczak-Bargiela, A, Przewlocki, R, Przewlocka, B (2009) Differential activation of spinal microglial and astroglial cells in a mouse model of peripheral neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* **623**(1-3): 65-72.
- Milligan, ED, Langer, SJ, Sloane, EM, He, L, Wieseler-Frank, J, O'Connor, K, Martin, D, Forsayeth, JR, Maier, SF, Johnson, K, Chavez, RA, Leinwand, LA, Watkins, LR (2005) Controlling pathological pain by adenovirally driven spinal production of the anti-inflammatory cytokine, interleukin-10. *Eur J Neurosci* **21**(8): 2136-2148.
- Milligan, ED, Soderquist, RG, Malone, SM, Mahoney, JH, Hughes, TS, Langer, SJ, Sloane, EM, Maier, SF, Leinwand, LA, Watkins, LR, Mahoney, MJ (2006) Intrathecal polymer-based interleukin-10 gene delivery for neuropathic pain. *Neuron Glia Biol* **2**(4): 293-308.
- Milligan, ED, Zapata, V, Chacur, M, Schoeniger, D, Biedenkapp, J, O'Connor, KA, Verge, GM, Chapman, G, Green, P, Foster, AC, Naeve, GS, Maier, SF, Watkins, LR (2004) Evidence that exogenous and endogenous fractalkine can induce spinal nociceptive facilitation in rats. *Eur J Neurosci* **20**(9): 2294-2302.
- Miyoshi, K, Obata, K, Kondo, T, Okamura, H, Noguchi, K (2008) Interleukin-18-mediated microglia/astrocyte interaction in the spinal cord enhances neuropathic pain processing after nerve injury. *J Neurosci* **28**(48): 12775-12787.
- Moalem, G, Xu, K, Yu, L (2004) T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. *Neuroscience* **129**(3): 767-777.
- Mor, D, Bembrick, AL, Austin, PJ, Wyllie, PM, Creber, NJ, Denyer, GS, Keay, KA (2010) Anatomically specific patterns of glial activation in the periaqueductal gray of the sub-population of rats showing pain and disability following chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Neuroscience* **166**(4): 1167-1184.
- Morin, N, Owolabi, SA, Harty, MW, Papa, EF, Tracy, TF, Jr., Shaw, SK, Kim, M, Saab, CY (2007) Neutrophils invade lumbar dorsal root ganglia after chronic constriction injury of the sciatic nerve. *J Neuroimmunol* **184**(1-2): 164-171.
- Mosconi, T, Kruger, L (1996) Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy: ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations. *Pain* **64**(1): 37-57.
- Moulin, DE, Clark, AJ, Gilron, I, Ware, MA, Watson, CP, Sessle, BJ, Coderre, T, Morley-Forster, PK, Stinson, J, Boulanger, A, Peng, P, Finley, GA, Taenzer, P, Squire, P, Dion, D, Chutkan, A, Gilani, A, Gordon, A, Henry, J, Jovey, R, Lynch, M, Mailis-Gagnon, A, Panju, A, Rollman, GB, Velly, A (2007) Pharmacological management of chronic neuropathic pain - consensus statement and guidelines from the Canadian Pain Society. *Pain Res Manag* **12**(1): 13-21.

Murphy, PG, Grondin, J, Altares, M, Richardson, PM (1995) Induction of interleukin-6 in axotomized sensory neurons. *J Neurosci* **15**(7 Pt 2): 5130-5138.

Murphy, PM, Baggiolini, M, Charo, IF, Hebert, CA, Horuk, R, Matsushima, K, Miller, LH, Oppenheim, JJ, Power, CA (2000) International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* **52**(1): 145-176.

Murtaugh, MP, Foss, DL (2002) Inflammatory cytokines and antigen presenting cell activation. *Vet Immunol Immunopathol* **87**(3-4): 109-121.

Noma, N, Khan, J, Chen, IF, Markman, S, Benoliel, R, Hadlaq, E, Imamura, Y, Eliav, E (2011) Interleukin-17 levels in rat models of nerve damage and neuropathic pain. *Neurosci Lett* **493**(3): 86-91.

Obata, K, Yamanaka, H, Kobayashi, K, Dai, Y, Mizushima, T, Katsura, H, Fukuoka, T, Tokunaga, A, Noguchi, K (2004) Role of MAP-kinase activation in injured and intact primary afferent neurons for mechanical and heat hypersensitivity after spinal nerve ligation. *J Neurosci* **24**(45): 10211-10222.

Oh, SB, Tran, PB, Gillard, SE, Hurley, RW, Hammond, DL, Miller, RJ (2001) Chemokines and glycoprotein120 produce pain hypersensitivity by directly exciting primary nociceptive neurons. *J Neurosci* **21**(14): 5027-5035.

Ohtori, S, Takahashi, K, Moriya, H, Myers, RR (2004) TNF-alpha and TNF-alpha receptor type 1 upregulation in glia and neurons after peripheral nerve injury: studies in murine DRG and spinal cord. *Spine (Phila Pa 1976)* **29**(10): 1082-1088.

Okamoto, K, Martin, DP, Schmelzer, JD, Mitsui, Y, Low, PA (2001) Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in rat sciatic nerve chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Exp Neurol* **169**(2): 386-391.

Pabreja, K, Dua, K, Sharma, S, Padi, SS, Kulkarni, SK (2011) Minocycline attenuates the development of diabetic neuropathic pain: Possible anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms. *Eur J Pharmacol*.

Padi, SS, Kulkarni, SK (2008) Minocycline prevents the development of neuropathic pain, but not acute pain: possible anti-inflammatory and antioxidant mechanisms. *Eur J Pharmacol* **601**(1-3): 79-87.

Paulsen, R, Contestabile, A, Villani, L, Fonnum, F (1987) An in vivo model for studying function of brain tissue temporarily devoid of glial cell metabolism: the use of fluorocitrate. *J Neurochem* **48**(5): 1377-1385.

Perkins, MN, Kelly, D (1994) Interleukin-1 beta induced-desArg9bradykinin-mediated thermal hyperalgesia in the rat. *Neuropharmacology* **33**(5): 657-660.

Perkins, NM, Tracey, DJ (2000) Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. *Neuroscience* **101**(3): 745-757.

Plunkett, JA, Yu, CG, Easton, JM, Bethea, JR, Yeziarski, RP (2001) Effects of IL-10 on pain behavior and gene expression following excitotoxic spinal cord injury in the rat. *Exp Neurol* **168**(1): 144-154.

Rabert, D, Xiao, Y, Yiangou, Y, Kreder, D, Sangameswaran, L, Segal, MR, Hunt, CA, Birch, R, Anand, P (2004) Plasticity of gene expression in injured human dorsal root ganglia revealed by GeneChip oligonucleotide microarrays. *J Clin Neurosci* **11**(3): 289-299.

Raghavendra, V, Tanga, F, DeLeo, JA (2003) Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther* **306**(2): 624-630.

Ramer, MS, Murphy, PG, Richardson, PM, Bisby, MA (1998) Spinal nerve lesion-induced mechanoallodynia and adrenergic sprouting in sensory ganglia are attenuated in interleukin-6 knockout mice. *Pain* **78**(2): 115-121.

Roberts, AB, Sporn, MB (1993) Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth Factors* **8**(1): 1-9.

Rolan, P, Gibbons, JA, He, L, Chang, E, Jones, D, Gross, MI, Davidson, JB, Sanftner, LM, Johnson, KW (2008) Ibutilast in healthy volunteers: safety, tolerability and pharmacokinetics with single and multiple doses. *Br J Clin Pharmacol* **66**(6): 792-801.

Rotty, J, Heinzerling, L, Schurmann, D, Suttorp, N (2006) Interleukin-2: a potential treatment option for postherpetic neuralgia? *Clin Infect Dis* **43**(12): e109-110.

Rozwarski, DA, Gronenborn, AM, Clore, GM, Bazan, JF, Bohm, A, Wlodawer, A, Hatada, M, Karplus, PA (1994) Structural comparisons among the short-chain helical cytokines. *Structure* **2**(3): 159-173.

Saarto, T, Wiffen, PJ (2005) Antidepressants for neuropathic pain. *Cochrane Database Syst Rev*(3): CD005454.

Sacerdote, P, Franchi, S, Trovato, AE, Valsecchi, AE, Panerai, AE, Colleoni, M (2008) Transient early expression of TNF-alpha in sciatic nerve and dorsal root ganglia in a mouse model of painful peripheral neuropathy. *Neurosci Lett* **436**(2): 210-213.

Saldanha, G, Bar, KJ, Yiangou, Y, Anand, P, Birch, R, Carlstedt, T, Burrin, JM (2000) Marked Increase of IL-6 in injured human nerves and dorsal root ganglia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **69**(5): 693-694.

Sanchez-Munoz, F, Dominguez-Lopez, A, Yamamoto-Furusho, JK (2008) Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **14**(27): 4280-4288.

Sawada, T, Sano, M, Omura, T, Omura, K, Hasegawa, T, Funahashi, S, Nagano, A (2007) Spatiotemporal quantification of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 after crush injury in rat sciatic nerve utilizing immunohistochemistry. *Neurosci Lett* **417**(1): 55-60.

Schäfers, M, Brinkhoff, J, Neukirchen, S, Marziniak, M, Sommer, C (2001) Combined epineurial therapy with neutralizing antibodies to tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 receptor has an additive effect in reducing neuropathic pain in mice. *Neurosci Lett* **310**(2-3): 113-116.

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

Schäfers, M, Sorkin, LS, Sommer, C (2003b) Intramuscular injection of tumor necrosis factor-alpha induces muscle hyperalgesia in rats. *Pain* **104**(3): 579-588.

Schäfers, M, Svensson, CI, Sommer, C, Sorkin, LS (2003c) Tumor necrosis factor-alpha induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons. *J Neurosci* **23**(7): 2517-2521.

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

Schweizer, A, Feige, U, Fontana, A, Muller, K, Dinarello, CA (1988) Interleukin-1 enhances pain reflexes. Mediation through increased prostaglandin E2 levels. *Agents Actions* **25**(3-4): 246-251.

Seltzer, Z, Dubner, R, Shir, Y (1990) A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* **43**(2): 205-218.

Sfikakis, PP (2010) The first decade of biologic TNF antagonists in clinical practice: lessons learned, unresolved issues and future directions. *Curr Dir Autoimmun* **11**: 180-210.

Shamash, S, Reichert, F, Rotshenker, S (2002) The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta. *J Neurosci* **22**(8): 3052-3060.

Singh, D, Smyth, L, Borrill, Z, Sweeney, L, Tal-Singer, R (2010) A randomized, placebo-controlled study of the effects of the p38 MAPK inhibitor SB-681323 on blood biomarkers of inflammation in COPD patients. *J Clin Pharmacol* **50**(1): 94-100.

Smyth, MJ, Cretney, E, Kershaw, MH, Hayakawa, Y (2004) Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunol Rev* **202**: 275-293.

Sommer, C (1999) [Animal studies on neuropathic pain: the role of cytokines and cytokine receptors in pathogenesis and therapy]. *Schmerz* **13**(5): 315-323.

Sommer, C, Marziniak, M, Myers, RR (1998) The effect of thalidomide treatment on vascular pathology and hyperalgesia caused by chronic constriction injury of rat nerve. *Pain* **74**(1): 83-91.

Sommer, C, Schafers, M (1998) Painful mononeuropathy in C57BL/Wld mice with delayed wallerian degeneration: differential effects of cytokine production and nerve regeneration on thermal and mechanical hypersensitivity. *Brain Res* **784**(1-2): 154-162.

Sommer, C, Schafers, M, Marziniak, M, Toyka, KV (2001) Etanercept reduces hyperalgesia in experimental painful neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* **6**(2): 67-72.

Sommer, C, Schmidt, C, George, A (1998b) Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. *Exp Neurol* **151**(1): 138-142.

Sorkin, LS, Yaksh, TL (2009) Behavioral models of pain states evoked by physical injury to the peripheral nerve. *Neurotherapeutics* **6**(4): 609-619.

Sweitzer, S, Martin, D, DeLeo, JA (2001a) Intrathecal IL-1 receptor antagonist in combination with soluble TNF receptor exhibits an anti-allodynic action in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience* **103**(2): 529-539.

Sweitzer, SM, Schubert, P, DeLeo, JA (2001b) Propentofylline, a glial modulating agent, exhibits antiallodynic properties in a rat model of neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* **297**(3): 1210-1217.

- Takeda, K, Muramatsu, M, Chikuma, T, Kato, T (2009) Effect of memantine on the levels of neuropeptides and microglial cells in the brain regions of rats with neuropathic pain. *J Mol Neurosci* **39**(3): 380-390.
- Tanaka, T, Minami, M, Nakagawa, T, Satoh, M (2004) Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in the dorsal root ganglia in a rat model of neuropathic pain: possible involvement in the development of neuropathic pain. *Neurosci Res* **48**(4): 463-469.
- Tanga, FY, Raghavendra, V, DeLeo, JA (2004) Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain. *Neurochem Int* **45**(2-3): 397-407.
- Tayal, V, Kalra, BS (2008) Cytokines and anti-cytokines as therapeutics--an update. *Eur J Pharmacol* **579**(1-3): 1-12.
- Thacker, MA, Clark, AK, Bishop, T, Grist, J, Yip, PK, Moon, LD, Thompson, SW, Marchand, F, McMahon, SB (2009) CCL2 is a key mediator of microglia activation in neuropathic pain states. *Eur J Pain* **13**(3): 263-272.
- Thacker, MA, Clark, AK, Marchand, F, McMahon, SB (2007) Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules. *Anesth Analg* **105**(3): 838-847.
- Thompson, SW, Majithia, AA (1998) Leukemia inhibitory factor induces sympathetic sprouting in intact dorsal root ganglia in the adult rat in vivo. *J Physiol* **506** (Pt 3): 809-816.
- Thompson, SW, Vernallis, AB, Heath, JK, Priestley, JV (1997) Leukaemia inhibitory factor is retrogradely transported by a distinct population of adult rat sensory neurons: co-localization with trkA and other neurochemical markers. *Eur J Neurosci* **9**(6): 1244-1251.
- Thomson, A, Lotzke, M (2003) *The cytokines handbook*. Vol. 1. Academic: London/San Diego.
- Tian, H, Cronstein, BN (2007) Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis* **65**(3): 168-173.
- Tobinick, E, Davoodifar, S (2004) Efficacy of etanercept delivered by perispinal administration for chronic back and/or neck disc-related pain: a study of clinical observations in 143 patients. *Curr Med Res Opin* **20**(7): 1075-1085.
- Tsuda, M, Mizokoshi, A, Shigemoto-Mogami, Y, Koizumi, S, Inoue, K (2004) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. *Glia* **45**(1): 89-95.
- Uceyler, N, Gobel, K, Meuth, SG, Ortler, S, Stoll, G, Sommer, C, Wiendl, H, Kleinschnitz, C (2010) Deficiency of the negative immune regulator B7-H1 enhances inflammation and neuropathic pain after chronic constriction injury of mouse sciatic nerve. *Exp Neurol* **222**(1): 153-160.
- Uceyler, N, Rogausch, JP, Toyka, KV, Sommer, C (2007a) Differential expression of cytokines in painful and painless neuropathies. *Neurology* **69**(1): 42-49.
- Uceyler, N, Tschärke, A, Sommer, C (2007b) Early cytokine expression in mouse sciatic nerve after chronic constriction nerve injury depends on calpain. *Brain Behav Immun* **21**(5): 553-560.

Vale, ML, Marques, JB, Moreira, CA, Rocha, FA, Ferreira, SH, Poole, S, Cunha, FQ, Ribeiro, RA (2003) Antinociceptive effects of interleukin-4, -10, and -13 on the writhing response in mice and zymosan-induced knee joint incapacitation in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **304**(1): 102-108.

Valsecchi, AE, Franchi, S, Panerai, AE, Sacerdote, P, Trovato, AE, Colleoni, M (2008) Genistein, a natural phytoestrogen from soy, relieves neuropathic pain following chronic constriction sciatic nerve injury in mice: anti-inflammatory and antioxidant activity. *J Neurochem* **107**(1): 230-240.

van Mourik, MS, Macklon, NS, Heijnen, CJ (2009) Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. *J Leukoc Biol* **85**(1): 4-19.

Wagner, R, Myers, RR (1996) Endoneurial injection of TNF-alpha produces neuropathic pain behaviors. *Neuroreport* **7**(18): 2897-2901.

Wagner, R, Myers, RR, O'Brien, JS (1998) Prosaptide prevents hyperalgesia and reduces peripheral TNFR1 expression following TNF-alpha nerve injection. *Neuroreport* **9**(12): 2827-2831.

Wallace, VC, Blackbeard, J, Segerdahl, AR, Hasnie, F, Pheby, T, McMahon, SB, Rice, AS (2007) Characterization of rodent models of HIV-gp120 and anti-retroviral-associated neuropathic pain. *Brain* **130**(Pt 10): 2688-2702.

Watkins, LR, Milligan, ED, Maier, SF (2003) Glial proinflammatory cytokines mediate exaggerated pain states: implications for clinical pain. *Adv Exp Med Biol* **521**: 1-21.

Watkins, LR, Wiertelak, EP, Goehler, LE, Smith, KP, Martin, D, Maier, SF (1994) Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. *Brain Res* **654**(1): 15-26.

Whitehead, KJ, Smith, CG, Delaney, SA, Curnow, SJ, Salmon, M, Hughes, JP, Chessell, IP (2010) Dynamic regulation of spinal pro-inflammatory cytokine release in the rat in vivo following peripheral nerve injury. *Brain Behav Immun* **24**(4): 569-576.

Whittington, R, Faulds, D (1993) Interleukin-2. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in patients with cancer. *Drugs* **46**(3): 446-514.

Widmann, C, Gibson, S, Jarpe, MB, Johnson, GL (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* **79**(1): 143-180.

Wieseler-Frank, J, Maier, SF, Watkins, LR (2005) Central proinflammatory cytokines and pain enhancement. *Neurosignals* **14**(4): 166-174.

Wieseler-Frank, J, Maier, SF, Watkins, LR (2004) Glial activation and pathological pain. *Neurochem Int* **45**(2-3): 389-395.

Wolf, G, Gabay, E, Tal, M, Yirmiya, R, Shavit, Y (2006) Genetic impairment of IL-1 signaling attenuates neuropathic pain, autotomy, and spontaneous ectopic neuronal activity, following nerve injury in mice. *Pain* **120**(3): 315-324.

Xie, W, Liu, X, Xuan, H, Luo, S, Zhao, X, Zhou, Z, Xu, J (2006) Effect of betamethasone on neuropathic pain and cerebral expression of NF-kappaB and cytokines. *Neurosci Lett* **393**(2-3): 255-259.

Xie, W, Strong, JA, Zhang, JM (2009) Early blockade of injured primary sensory afferents reduces glial cell activation in two rat neuropathic pain models. *Neuroscience* **160**(4): 847-857.

- Xu, JT, Xin, WJ, Zang, Y, Wu, CY, Liu, XG (2006) The role of tumor necrosis factor-alpha in the neuropathic pain induced by Lumbar 5 ventral root transection in rat. *Pain* **123**(3): 306-321.
- Yamashita, M, Ohtori, S, Koshi, T, Inoue, G, Yamauchi, K, Suzuki, M, Takahashi, K (2008) Tumor necrosis factor-alpha in the nucleus pulposus mediates radicular pain, but not increase of inflammatory peptide, associated with nerve damage in mice. *Spine (Phila Pa 1976)* **33**(17): 1836-1842.
- Yao, MZ, Gu, JF, Wang, JH, Sun, LY, Lang, MF, Liu, J, Zhao, ZQ, Liu, XY (2002) Interleukin-2 gene therapy of chronic neuropathic pain. *Neuroscience* **112**(2): 409-416.
- Yu, LN, Yang, XS, Hua, Z, Xie, W (2009) [Serum levels of pro-inflammatory cytokines in diabetic patients with peripheral neuropathic pain and the correlation among them]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **89**(7): 469-471.
- Zak-Prelich, M, McKenzie, RC, Sysa-Jedrzejowska, A, Norval, M (2003) Local immune responses and systemic cytokine responses in zoster: relationship to the development of postherpetic neuralgia. *Clin Exp Immunol* **131**(2): 318-323.
- Zanella, JM, Burright, EN, Hildebrand, K, Hobot, C, Cox, M, Christoferson, L, McKay, WF (2008) Effect of etanercept, a TNF- α inhibitor, on neuropathic pain in the rat chronic constriction injury model. *Spine (Phila Pa 1976)* **33**(3): 227-234.
- Zanjani, TM, Sabetkasaei, M, Mosaffa, N, Manaheji, H, Labibi, F, Farokhi, B (2006) Suppression of IL-6 by minocycline in a rat model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* **538**(1-3): 66-72.
- Zelenka, M, Schafers, M, Sommer, C (2005) Intraneural injection of IL-1beta and TNF-alpha into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain. *Pain* **116**(3): 257-263.
- Zhang, J, De Koninck, Y (2006) Spatial and temporal relationship between MCP-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury. *J Neurochem* **97**(3): 772-783.
- Zhang, J, Shi, XQ, Echeverry, S, Mogil, JS, De Koninck, Y, Rivest, S (2007) Expression of CCR2 in both resident and bone marrow-derived microglia plays a critical role in neuropathic pain. *J Neurosci* **27**(45): 12396-12406.
- Zhuang, ZY, Kawasaki, Y, Tan, PH, Wen, YR, Huang, J, Ji, RR (2007) Role of the CX3CR1/p38 MAPK pathway in spinal microglia for the development of neuropathic pain following nerve injury-induced cleavage of fractalkine. *Brain Behav Immun* **21**(5): 642-651.
- Zhuang, ZY, Wen, YR, Zhang, DR, Borsello, T, Bonny, C, Strichartz, GR, Decosterd, I, Ji, RR (2006) A peptide JNK inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. *J Neurosci* **26**(13): 3551-3560.
- Zidek, Z, Anzenbacher, P, Kmonickova, E (2009) Current status and challenges of cytokine pharmacology. *Br J Pharmacol* **157**(3): 342-361.

D. Douleur neuropathique et antidépresseurs

« Pourquoi prendre un antidépresseur pour soulager la douleur si je ne suis pas déprimé ? » Cette question pourrait être posée par un patient douloureux à un médecin quand il lui prescrit un antidépresseur comme traitement antalgique. Les raisons de l'efficacité antalgique des antidépresseurs restent mal connues : l'inhibition de la recapture des monoamines, la sérotonine et la noradrénaline, est systématiquement évoquée, mais d'autres propriétés susceptibles d'interférer avec les phénomènes de sensibilisation qui accompagnent la chronicité de la douleur pourraient également intervenir.

I. Traitement de la douleur neuropathique par les antidépresseurs : Informations cliniques

1. Action antalgique propre

Pour la première fois en 1960, il a été rapporté qu'un traitement par un antidépresseur, l'imipramine, présentait un effet antalgique chez un patient douloureux neuropathique (Paoli et al., 1960). Depuis, de nombreuses études cliniques ont suivi (Davis et al., 1977; Onghena and Van Houdenhove, 1992; McQuay et al., 1996) et ont confirmé l'efficacité d'un traitement prolongé avec un antidépresseur dans un certain nombre de syndromes douloureux chroniques, en particulier les douleurs neuropathiques. Cette utilisation désormais classique relève prioritairement de la capacité de ces molécules à moduler le message douloureux sans qu'intervienne leur composante thymoanaleptique (Max et al., 1987; Sindrup et al., 1992; Fishbain et al., 2000).

Il existe en effet un faisceau d'arguments cliniques en faveur d'un effet antalgique spécifique des antidépresseurs. Tout d'abord, une efficacité de traitement est observable chez des patients douloureux non dépressifs, ou chez des patients douloureux dépressifs mais sans effet significatif sur la dépression elle-même (Onghena and Van Houdenhove, 1992; Saarto and Wiffen, 2005). De plus, la dose d'antidépresseur tricyclique utile pour obtenir un effet antalgique optimal est en général trois fois plus faible que celle exigée dans un traitement contre la dépression (Goldstein et al., 2005; Sindrup et al., 2005). Notons également que le

délai d'action thérapeutique des antidépresseurs dans le traitement de la douleur chronique est plus court que dans la dépression (Goldstein et al., 2005; Hirschfeld et al., 2005; Mico et al., 2006) mais nécessite tout de même une à deux semaines dans de nombreux cas (Max et al., 1987; McQuay et al., 1996). Toutefois, les données ne sont pas univoques, puisque certaines études cliniques suggèrent qu'un effet thérapeutique significatif peut parfois être observé après 4 ou 5 jours de traitement (Sindrup et al., 1990; McQuay et al., 1992). Même si le délai d'action peut être raccourci, il est dans tous les cas nécessaire, suggérant ainsi que l'effet des antidépresseurs contre la douleur neuropathique pourrait, tout comme leur action contre la dépression (Covington et al., 2010), mettre en jeu des phénomènes de neuroplasticité. Enfin, l'hétérogénéité dans l'efficacité antalgique des différentes classes chimiques d'antidépresseurs, bien établie par plusieurs méta-analyses, n'existe pas pour leur effet psychotrope. C'est un autre argument fort d'une dissociation entre les deux propriétés (Onghena and Van Houdenhove, 1992; McQuay et al., 1996; Sindrup and Jensen, 1999; Finnerup et al., 2005). Malgré tous ces arguments pertinents en faveur d'un effet antalgique propre, on ne peut exclure chez certains patients, du fait de l'interrelation entre douleur chronique et troubles de l'humeur, un bénéfice thérapeutique sur la douleur lié à la seule propriété thymoanaleptique des antidépresseurs et réciproquement.

2. Efficacité des antidépresseurs

Bien que les antidépresseurs soient utilisés comme antalgiques depuis environ 40 ans, ce n'est que depuis 10-15 ans qu'ils ont été approuvés par les agences de contrôle du médicament pour leur utilisation dans la prise en charge de douleurs neuropathiques (McQuay et al., 1996; Vrethem et al., 1997). Cette reconnaissance est rendue possible par le grand nombre d'études publiées dans lesquelles leur efficacité est rapportée (Saarto and Wiffen, 2005, 2010). Ces études sont toutefois difficiles à comparer entre elles. En effet, elles diffèrent par le type de douleur à traiter, le type d'antidépresseur choisi, les doses recommandées ou encore la durée du traitement. Des méta-analyses prenant en compte cette hétérogénéité ont néanmoins conclu que les antidépresseurs sont des médicaments utiles pour la prise en charge de la douleur chronique et notamment de la douleur neuropathique (Finnerup et al., 2005; Saarto and Wiffen, 2005, 2007; Finnerup et al., 2010; Saarto and Wiffen, 2010).

Un consensus existe sur le fait que les antidépresseurs tricycliques (ATC) sont ceux qui présentent le plus grand effet antalgique sur les douleurs neuropathiques (McQuay et al., 1996; Finnerup et al., 2005; Colombo et al., 2006). Des effets indésirables, liés notamment à

Classe	Mode d'action principal	Exemples
IMAO	Inhibition de la monoamine oxydase A	Moclobemide (<i>Moclamine</i> ®)
ATC	Inhibition de la recapture des monoamines	Amitriptyline (<i>Laroxyl</i> ®) Clomipramine(<i>Anafranil</i> ®) Imipramine(<i>Tofranil</i> ®) Nortriptyline (<i>Pamelor</i> ®)
IRS	Inhibition sélective de la recapture de la sérotonine	Fluoxétine (<i>Prozac</i> ®) Paroxétine (<i>Deroxat</i> ®) Citalopram (<i>Seropram</i> ®)
IRN	Inhibition sélective de la recapture de la noradrénaline	Reboxétine (<i>Edronax</i> ®)
IRSN	Inhibition mixte de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline	Duloxétine (<i>Cymbalta</i> ®) Venlafaxine (<i>Effexor</i> ®) Milnacipran (<i>Ixel</i> ®)
Atypique	Mal connu	Bupropion (<i>Zyban</i> ®) Nefazodone (<i>Serzone</i> ®)

Tableau D1. Les différentes classes d'antidépresseurs et leurs principaux représentants.

des propriétés anticholinergiques ou α -bloquantes, sont présents mais ils sont moins fréquents et moins sévères que quand les ATC sont utilisés contre la dépression (Feighner, 1999; Murray, 2000). Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (IRS), qui provoquent beaucoup moins d'effets indésirables, ont aussi été testés pour traiter la douleur chronique. C'est le cas de la fluoxétine, du citalopram, de la fluvoxamine, de la sertraline ou de la paroxétine. Mais l'analgésie obtenue est moindre que celle provoquée par les antidépresseurs tricycliques (Max et al., 1992; Finnerup et al., 2005; McDermott et al., 2006) et l'effet de la fluoxétine n'a été observé que sur une population neuropathique et dépressive (Max et al., 1992). Aucune étude clinique ne démontre pour l'instant que les IRS pourraient présenter un bénéfice thérapeutique chez des patients neuropathiques non dépressifs.

Les inhibiteurs spécifiques de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (IRSN), qui sont d'autres antidépresseurs non tricycliques, ont récemment fait leur apparition dans le traitement de la douleur chronique. Ils incluent la venlafaxine, le milnacipran ou la duloxétine (Briley, 2004). Dans les études cliniques, ces IRSN ont démontré une meilleure tolérabilité, en raison de leurs faibles effets secondaires, par comparaison aux ATC. Ainsi, la duloxétine fut le premier IRSN à obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour traiter les patients neuropathiques diabétiques (Anon., 2005).

Des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la noradrénaline seule, comme la réboxétine, ont été moins largement utilisés comme traitement antalgique ; un effet thérapeutique a pu être observé (Krell et al., 2005), ce qui suggère que la composante noradrénergique serait importante pour l'effet antalgique des antidépresseurs. D'autres antidépresseurs qui ne sont pas des inhibiteurs spécifiques de la recapture de la noradrénaline ou de la sérotonine comme la trazodone, la mirtazapine, la miansérine et la nefazodone, ont aussi montré une action thérapeutique analgésique dans certains cas (Ansari, 2000). Il y a par contre un manque d'évidence concernant l'efficacité des inhibiteurs de monoamine oxydase (MAO), enzyme clé dans la dégradation des monoamines, comme le moclobémide (Menkes et al., 1995). Le bupropion, un inhibiteur de la recapture de la dopamine mais aussi de la noradrénaline, a une efficacité très réduite dans le traitement de la douleur neuropathique (Sindrup et al., 2005) (**Tableau D1**).

Les ATC et les IRSN apparaissent comme les traitements antidépresseurs les plus efficaces dans la prise en charge de la douleur neuropathique (Briley, 2004). Pourtant, il faut garder en tête que l'ensemble des études cliniques et des méta-analyses réalisées sur le sujet aboutissent à la même conclusion, c'est-à-dire à une efficacité partielle des antidépresseurs. Selon une récente méta-analyse, le meilleur niveau d'efficacité dans les douleurs neuropathiques est au

	Polyneuropathie douloureuse		Neuropathie post-herpétique		Lésion nerveuse périphérique		Neuropathie post-VIH		Douleur neuropathique centrale	
Classe d'antidépresseur	Essais cliniques (+) ou (-)	NNT	Essais cliniques (+) ou (-)	NNT	Essais cliniques (+) ou (-)	NNT	Essais cliniques (+) ou (-)	NNT	Essais cliniques (+) ou (-)	NNT
ATC	11 +	2,1	4 +	2,8	1+ / 1-		2 -		2 +	2,7
IRSN	5 +	5			1-					
IRS	3+ / 1 -	6,8								

Tableau D2. Efficacité clinique des différentes classes d'antidépresseur en fonction de l'étiologie des douleurs neuropathiques (adapté de Finnerup et al. 2010).

Le tableau indique le nombre d'essais cliniques positifs (+) ou négatifs (-), et le NNT (Number Needed to Treat) qui correspond au nombre de patients nécessaire à traiter avec un médicament donné pour obtenir un bénéfice thérapeutique chez un sujet (ici un soulagement de la douleur de 50%).

ATC : Antidépresseur tricyclique

IRSN : Inhibiteur spécifique de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline

IRS : Inhibiteur spécifique de la recapture de la sérotonine

mieux de 50% et est obtenu avec les ATC (Finnerup et al., 2010). Les valeurs issues de ces méta-analyses sont des valeurs populationnelles. Elles n'excluent pas une efficacité importante du médicament chez tel ou tel patient. Plutôt que de parler d'efficacité partielle, il serait plus légitime de parler d'efficacité inégale. En ce sens, il convient ici de rappeler que les douleurs neuropathiques sont caractérisées par une étiologie et une sémiologie très variées affectant le système nerveux périphérique ou central. Dans ce contexte d'hétérogénéités étiologique, sémiologique et par conséquent mécanistique, il apparaît évident que les traitements ne peuvent pas être efficaces pour toutes les variantes de douleur neuropathique. Un exemple pour étayer ce propos est celui des douleurs neuropathiques faisant suite à une infection par le virus d'immunodéficience humaine, où un traitement par l'amitriptyline reste inefficace (Kieburtz et al., 1998; Shlay et al., 1998) (**Tableau D2**).

II. Traitement de la douleur neuropathique par les antidépresseurs : Informations précliniques

La plupart des renseignements concernant le mécanisme d'action antalgique des antidépresseurs ont été obtenus à partir de modèles animaux (rats et souris). Toutefois beaucoup d'études utilisent des modèles de douleur aiguë dans lesquels différents stimuli nocifs (thermique, chimique, mécanique ou électrique) sont appliqués, alors que les antidépresseurs ne sont pas utilisés en clinique pour traiter de telles douleurs. De plus, les administrations aiguës sont souvent utilisées en recherche expérimentale, alors que les antidépresseurs sont utilisés en clinique comme un traitement au long cours des douleurs neuropathiques. Ainsi, en raison de conditions pathologiques et thérapeutiques différentes, ces données ne peuvent pas forcément être extrapolées à la douleur neuropathique chez l'homme (Blackburn-Munro, 2004). Pour preuve, les antidépresseurs n'ont pas démontré d'efficacité clinique dans la douleur postopératoire (Gordon et al., 1994), suggérant que les modifications neuroplastiques qui accompagnent les douleurs chroniques et non aiguës (Voscopoulos and Lema, 2010) sont essentielles à la manifestation de l'efficacité des antidépresseurs.

1. Traitement par les antidépresseurs : aigu versus prolongé

En clinique, l'utilisation d'IRS a montré peu d'efficacité dans le traitement des douleurs neuropathiques (Finnerup et al., 2010; Saarto and Wiffen, 2010) et en préclinique la majorité

des auteurs s'accordent à dire que les IRS n'ont aucune action aiguë antalgique dans des modèles traumatiques de douleur neuropathique (Jett et al., 1997; Sawynok et al., 1999; Bomholt et al., 2005; Obata et al., 2005; Ikeda et al., 2009). Malgré cela, certains auteurs ont quand même observé un effet intrathécal antalgique d'un IRS dans un modèle de douleur neuropathique diabétique (Ikeda et al., 2009) ou un effet antiallodynique dans une neuropathie traumatique tardive (Nozaki and Kamei, 2006). Pour les IRSN, certains auteurs n'ont observé aucun effet antalgique sur l'allodynie mécanique (Yalcin et al., 2009a), alors que d'autres groupes ont relevé une diminution des symptômes neuropathiques après administration aiguë systémique (Iyengar et al., 2004; Onal et al., 2007; Suzuki et al., 2008; Berrocoso et al., 2011) ou intrathécale (Suzuki et al., 2008; Ikeda et al., 2009). Cependant, le soulagement observé est transitoire et présente donc peu d'intérêt clinique. A noter que dans certaines études, de fortes doses d'antidépresseur ont été utilisées pour obtenir une diminution des symptômes neuropathiques (Iyengar et al., 2004; Bomholt et al., 2005; Suzuki et al., 2008). Concernant les ATC, les résultats obtenus après administration aiguë sont également assez disparates. Certains auteurs n'observent qu'une diminution de l'hyperalgésie thermique mais sans aucune action sur l'allodynie mécanique et ceci même à forte dose (Esser and Sawynok, 1999; Sawynok et al., 1999; Bomholt et al., 2005), alors que d'autres auteurs ont pu constater soit une diminution (Ardid and Guilbaud, 1992; Berrocoso et al., 2011) soit aucune action sur l'allodynie mécanique (Benbouzid et al., 2008a; Yalcin et al., 2009a).

Pour être plus proche de la réalité clinique, différentes stratégies d'administration prolongée d'antidépresseurs dans des modèles de douleur neuropathique ont été utilisées. Basée sur une hypothèse pharmacocinétique, selon laquelle de fortes doses d'antidépresseur seraient antalgiques mais provoqueraient des effets secondaires, une stratégie d'injections répétées d'antidépresseur a été utilisée pour augmenter progressivement les taux sanguins d'antidépresseurs pour obtenir un effet antalgique. Ces études se sont intéressées à l'influence d'un traitement par injections répétées sur 24 heures chez des animaux neuropathiques et ont montré que les ATC ou les IRSN réduisaient l'hyperalgésie mécanique mesurée par pression de la patte (Ardid and Guilbaud, 1992; Marchand et al., 2003a; Wattiez et al., 2011). D'autres groupes ont essayé de modéliser un traitement journalier au long cours comme celui instauré chez les patients neuropathiques, en réalisant des administrations prolongées de une à trois semaines d'antidépresseurs. Certains traitements ont été effectués dès l'induction de la neuropathie alors que d'autres, pour se rapprocher des conditions cliniques, ont été réalisés sur une neuropathie installée. Dans le premier cas, les résultats sont contrastés puisqu'un

traitement de deux semaines par la désipramine diminue l'allodynie mécanique et ceci dès le deuxième jour (Jones et al., 2009) alors qu'un traitement de trois semaines par l'amitriptyline améliore l'hyperalgésie thermique mais pas l'allodynie mécanique (Esser et al., 2001). Par contre, dans le cas du traitement d'une neuropathie installée, les groupes ayant choisi cette approche ont observé des effets thérapeutiques aussi bien avec les ATC que les IRSN. Un traitement d'une semaine avec le milnacipran ou l'amitriptyline, débuté une semaine après la chirurgie, réduit les symptômes neuropathiques (King et al., 2006; Berrocoso et al., 2011). De plus, sur une neuropathie installée depuis une ou deux semaines, un traitement de deux ou trois semaines avec un ATC (Benbouzid et al., 2008a; Matsuzawa-Yanagida et al., 2008; Yalcin et al., 2009a), un IRSN (Matsuzawa-Yanagida et al., 2008; Takeda et al., 2009; Yalcin et al., 2009a) ou un IRS (Yalcin et al., 2009a) abolit l'allodynie mécanique dès une à deux semaines de traitement, alors qu'un IRS (fluoxétine) n'a aucune action antalgique (Benbouzid et al., 2008a). Ces données thérapeutiques sur l'animal semblent correspondre aux données cliniques tant dans leur délai d'action que dans leur composante monoaminergique majoritaire. La noradrénaline semble donc une composante essentielle du mécanisme d'action antalgique des antidépresseurs. Si le délai thérapeutique suggère un effet antalgique indirect, le site d'action et le mécanisme précis restent cependant à déterminer.

2. Traitement par les antidépresseurs : effet périphérique et/ou central

La plupart des études recherchant le site d'action potentiel des antidépresseurs ont utilisé des protocoles d'administration aiguë. Avec une administration systémique (intrapéritonéale, sous-cutanée ou *per os*), il est difficile de déterminer la localisation précise du site d'action dans le système nerveux, exception faite de molécules ne traversant pas la barrière hémato-encéphalique. Pour pallier ce manque d'information primordiale dans l'étude du mécanisme d'action, certains auteurs ont eu recours à des approches lésionnelles ou à des administrations locales d'antidépresseur ou des bloqueurs de son action.

Peu de travaux se sont intéressés à la composante supraspinale de l'effet antalgique d'un antidépresseur. L'injection intracérébroventriculaire d'un IRS n'a aucun effet sur l'allodynie neuropathique (Honda et al., 2006). Par contre, celle d'un IRSN reverse les comportements neuropathiques et est bloqué par une lésion noradrénergique spinale (Suzuki et al., 2008). Cela suggère un rôle potentiel des contrôles inhibiteurs descendants noradrénergiques.

Pour de nombreuses études, l'administration intrathécale d'antidépresseur (ATC, IRSN ou IRS) atténue les comportements neuropathiques (Esser and Sawynok, 1999; Honda et al.,

2006; Ikeda et al., 2009). D'autres études, au lieu d'administrer de façon intrathécale l'antidépresseur, ont détruit leur substrat thérapeutique ou bloqué des récepteurs cibles en aval. Par exemple, suite à une lésion noradrénergique spinale, un antidépresseur (IRSN, ATC) perd son efficacité thérapeutique (Suzuki et al., 2008; Arsenault and Sawynok, 2009). De même l'action antalgique d'un IRS disparaît après délétion sérotoninergique spinale ou blocage des récepteurs de la sérotonine (Honda et al., 2006). Il a aussi été montré qu'une section des voies bulbospinales empruntant le faisceau dorsolatéral supprimait les effets thérapeutiques aigus de la clomipramine (Ardid et al., 1995). L'effet thérapeutique d'une administration prolongée d'antidépresseur (ATC, IRSN, IRN) est quant à lui supprimé par une injection intrathécale d'un antagoniste sélectif du récepteur β_2 -adrénergique (β_2 -AR) (Yalcin et al., 2009a). De plus, suite à une lésion nerveuse, la transplantation intrathécale de cellules chromaffines, source de noradrénaline, atténue l'allodynie neuropathique avec un délai thérapeutique d'une à deux semaines (Decosterd et al., 1998; Yu et al., 1998). Ces études confirment d'une part que la noradrénaline constitue un élément important dans l'action antiallodynique d'un traitement antidépresseur prolongé et d'autre part que la localisation de cette action pourrait se situer aux niveaux spinal ou ganglionnaire. En effet, un problème se pose lors de ces administrations intrathécales : elles peuvent en effet toucher le système nerveux central (moelle épinière) et périphérique (ganglions rachidiens) (Deval et al., 2011).

Même si la plupart des études sur les antidépresseurs se sont concentrées sur leur action antalgique centrale, un effet périphérique a aussi été suggéré (Sawynok and Reid, 2003; Mico et al., 2006). Là encore les résultats peuvent être contradictoires. En effet, une action antalgique a pu être observée après injection intraplantaire d'un ATC mais pas d'un IRSN (Esser and Sawynok, 1999; Suzuki et al., 2008). En clinique, l'application topique d'antidépresseur de courte durée ou à faible dose n'a pas d'effet thérapeutique (Lynch et al., 2005; Ho et al., 2008). Par contre, une application prolongée, à doses plus importantes, conduit à un effet antalgique après une dizaine de jours (McCleane, 2000b, a) mais ceci se révèle être accompagné d'une absorption systémique (Lynch et al., 2005; Ho et al., 2008). De plus, l'application directe d'antidépresseur sur un nerf pourrait être neurotoxique (Estebe and Myers, 2004).

3. Traitement par les antidépresseurs : mécanisme d'action

a. Hypothèse monoaminergique

Il est habituel de considérer que la capacité des antidépresseurs à inhiber la recapture des monoamines, initialement démontrée *in vitro*, sous-tend leurs effets thymoanaleptique et antalgique (Mico et al., 2006).

Quelques études ont été réalisées chez différentes lignées de souris déficientes pour les transporteurs de la noradrénaline (NET) ou de la sérotonine (SERT) pour tenter d'évaluer l'action antalgique des antidépresseurs. Les souris déficientes pour NET ou SERT sont considérées comme des modèles de traitement au long cours par les antidépresseurs (Lesch and Heils, 2000; Xu et al., 2000). Ainsi, suite à une constriction du nerf sciatique, les souris SERT-/- ne développent pas d'hyperalgésie thermique, mais présentent une allodynie mécanique bilatérale alors que les souris de phénotype sauvage développent une hyperalgésie et une allodynie ipsilatérales (Vogel et al., 2003). L'absence d'hyperalgésie thermique serait expliquée par une diminution des concentrations en sérotonine au niveau du nerf sciatique lésé (Vogel et al., 2003). Concernant l'apparition d'une allodynie contralatérale, ce phénomène a déjà pu être observé lors d'injection aiguë à forte dose d'amitriptyline (Esser and Sawynok, 1999). De plus, les antidépresseurs (fluoxétine, amitriptyline ou duloxétine) administrés de façon aiguë à très forte dose perdent leur propriété analgésique chez des souris déficientes en neurones sérotoninergiques (Zhao et al., 2007b).

Les souris NET-/- présentent une hypoalgésie basale (Bohn et al., 2000) plus prononcée que les souris SERT-/- (Hall et al., 2011). L'augmentation des concentrations en noradrénaline est ainsi corrélée à une élévation du seuil nociceptif (Xu et al., 2000). Réciproquement, l'absence de noradrénaline tissulaire chez des souris déficientes en Dopamine β -Hydroxylase (D β H) induit une hyperalgésie réversible par l'injection d'un agoniste α_2 -AR, la clonidine (Jasmin et al., 2002). En utilisant des souris déficientes pour le SERT et/ou le NET, un rôle prédominant du NET semble présent dans l'analgésie aiguë produite par l'amitriptyline (Hall et al., 2011). De façon intéressante, l'effet antalgique aigu de l'amitriptyline est réduit chez des souris déficientes pour l' α_2 -AR (Ozdogan et al., 2004). De même, l'effet antinociceptif aigu d'un ATC est réduit en bloquant les β_1 - et/ou β_2 -AR (Mico et al., 1997). Par contre pour d'autres auteurs, l'effet antiallodynique d'une administration prolongée d'ATC, IRSN ou IRN serait

perdu en bloquant spécifiquement le β_2 -AR ou en utilisant des souris déficientes pour ce même récepteur (Yalcin et al., 2009b; Yalcin et al., 2009a).

La noradrénaline et la sérotonine *via* leurs récepteurs sont donc impliquées dans le contrôle de l'information nociceptive à différents niveaux du système nerveux, mais aussi dans l'effet antalgique des antidépresseurs. Comme les antidépresseurs inhibent la recapture de la noradrénaline et/ou de la sérotonine, leur effet thérapeutique pourrait passer par une action directe sur les contrôles descendants inhibiteurs spinaux. Ils faciliteraient l'action de ces contrôles en inhibant la recapture de la noradrénaline et de la sérotonine libérées dans la corne dorsale de la moelle épinière. Il a ainsi été montré qu'une section des voies bulbospinales véhiculées par le faisceau dorsolatéral supprimait les effets thérapeutiques aigus de la clomipramine (Ardid et al., 1995). Cet effet antalgique des antidépresseurs peut être potentialisé en bloquant les récepteurs de la sérotonine 1A, qui ont une influence pronociceptive, dans différents modèles de douleur neuropathique (Ardid et al., 2001; Anjaneyulu and Chopra, 2004; Marchand et al., 2004). Les antidépresseurs peuvent ainsi augmenter les seuils de réponse nociceptifs en facilitant les systèmes de contrôle endogènes descendants, issus notamment du locus coeruleus, des noyaux noradrénergiques du tronc cérébral et des noyaux dorsaux et magnus du raphé (Millan, 1999). En effet, une délétion spinale noradrénergique par 6-hydroxydopamine bloque l'effet aigu d'un IRSN (Suzuki et al., 2008). De façon réciproque, l'effet aigu d'un IRS est perdu suite à une délétion spinale sérotoninergique par 5,7-hydroxytryptamine ou suite à l'utilisation d'un antagoniste du récepteur de la sérotonine 2 (Honda et al., 2006). Même si l'hypothèse spinale ou supraspinale est la plus étudiée, nous ne pouvons pas exclure comme autre source endogène de noradrénaline le système nerveux sympathique (Selmecky et al., 2003) qui pourrait ainsi fournir un substrat thérapeutique aux antidépresseurs, notamment grâce au bourgeonnement observé dans les ganglions rachidiens (McLachlan et al., 1993).

Par ailleurs, même si ce mécanisme inhibiteur de la recapture de monoamines est de nature à expliquer à lui seul l'effet antalgique des antidépresseurs, d'autres études ont pu démontrer l'implication éventuelle d'autres mécanismes neurochimiques.

b. Hypothèse opioïdergique

Le système opioïdergique joue un rôle prépondérant dans les contrôles inhibiteurs de la douleur (Mogil et al., 2000; Gaveriaux-Ruff and Kieffer, 2002; Dierich and Kieffer, 2004) et certaines études plaident en faveur de son implication dans l'effet thérapeutique des

antidépresseurs. Des travaux menés chez l'animal naïf comme chez l'animal douloureux chronique montrent que la naloxone, antagoniste des récepteurs opioïdes, bloque les propriétés antalgiques aiguës ou répétées des antidépresseurs (Ardid and Guilbaud, 1992; Valverde et al., 1994; Gray et al., 1998; Schreiber et al., 2000; Marchand et al., 2003a; Wattiez et al., 2011). A l'inverse de ces données, de plus rares études n'ont observé aucune influence après administration de naloxone sur l'effet antalgique aigu des antidépresseurs (Spiegel et al., 1983; Ghelardini et al., 2000; Obata et al., 2010). Toutefois, la plupart de ces études ne concernent pas la condition neuropathique ou ne se sont pas intéressées aux conséquences d'un traitement à long terme d'un antidépresseur. De plus, le manque de sélectivité de différents antagonistes, comme la naloxone, limite la possibilité d'identifier spécifiquement les récepteurs opioïdes impliqués. Même s'il a été proposé que les effets d'injections répétées de clomipramine sur l'hyperalgésie neuropathique agissent par l'activation des MOR spinaux et DOR supraspinaux (Marchand et al., 2003a), la participation respective des divers récepteurs opioïdes dans l'effet thérapeutique des antidépresseurs reste peu étudiée. Une étude menée au laboratoire a cependant permis de mettre en évidence un recrutement plus particulier des DOR, suite à une administration prolongée d'un ATC dans un modèle de douleur neuropathique (Benbouzid et al., 2008a; Benbouzid et al., 2008c). Ainsi, le recrutement du système opioïde endogène suite à une administration d'antidépresseur peut laisser présager de couplages privilégiés entre systèmes monoaminergique et opioïdergique. En effet, suite à l'administration prolongée d'un antidépresseur (ATC ou IRSN), certains auteurs ont pu constater une interrelation entre l' α_2 -AR et le MOR en condition non douloureuse (Canciani et al., 2006; Giaroni et al., 2008), alors qu'une association entre le β_2 -AR et le DOR a été suggérée dans un modèle de douleur neuropathique (Yalcin et al., 2010).

c. Hypothèse neuro-immune

L'inhibition de recapture de monoamines apparaît souvent comme le mécanisme premier dans l'action antalgique des antidépresseurs. Nous avons vu précédemment dans le chapitre de l'introduction « implication des cytokines dans la douleur neuropathique » que ces cytokines pourraient jouer un rôle de premier plan dans le développement et/ou le maintien de la douleur neuropathique. Dans le domaine de la dépression, il a été suggéré qu'une perturbation de la balance entre cytokines pro- et anti-inflammatoires soit impliquée dans la pathologie (Sutcgil et al., 2007; Catena-Dell'Osso et al., 2011). Réciproquement, un traitement

antidépresseur a montré des propriétés anti-inflammatoires, notamment par la diminution de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (De Berardis et al., 2010; Hashioka, 2011). Une étude, en condition de douleur neuropathique, a également décrit une réduction de la production de TNF- α dans l'hippocampe et au site de lésion (nerf sciatique) : cette baisse est associée comportementalement à un effet thérapeutique d'une administration prolongée d'amitriptyline (Ignatowski et al., 2005; Sud et al., 2008). Ces auteurs vont même plus loin en suggérant que l'administration prolongée d'antidépresseur faciliterait la transmission noradrénergique en inhibant la production de TNF- α (Ignatowski et al., 2005; Reynolds et al., 2005). Ces données suggèrent que le TNF- α pourrait être un élément important du mécanisme thérapeutique des antidépresseurs dans la douleur neuropathique.

d. Autres hypothèses

Parmi les autres mécanismes d'action possibles non monoaminergiques des antidépresseurs, seuls seront envisagés les effets observés en condition neuropathique.

Outre leur action inhibitrice de recapture de monoamines, les ATC peuvent également se lier aux canaux ioniques voltage-dépendants (Amir et al., 2006). Leur action sur ces canaux ioniques a été proposée comme une composante à part entière de leur mécanisme d'action (Pancrazio et al., 1998). Cependant, l'affinité de liaison aux différents canaux sodium (Brau et al., 2001; Dick et al., 2007) ou potassium (Punke and Friederich, 2007) est de l'ordre du micromolaire, alors que leur activité au niveau des transporteurs de monoamines est de l'ordre du nanomolaire, soit 1000 fois plus importante. Ainsi, cette action sur les canaux ioniques pourrait expliquer l'action topique des antidépresseurs, mais peut difficilement rendre compte de l'effet d'administrations systémiques.

L'adénosine, produite par la déphosphorylation rapide de l'ATP, est libérée avec la noradrénaline des fibres du système nerveux sympathique (von Kugelgen et al., 1994). Une diminution des taux d'adénosine a été mesurée dans le sang et le liquide céphalo-rachidien de patients douloureux neuropathiques (Guieu et al., 1996). Ainsi, compenser ce déficit en adénosine fut une des solutions proposées dans la prise en charge de la douleur neuropathique (Guieu et al., 1994). L'adénosine pourrait participer à l'action des catécholamines dans la douleur neuropathique. En effet, la caféine, un antagoniste des récepteurs de l'adénosine, bloque l'effet d'une administration prolongée d'amitriptyline dans un modèle de douleur neuropathique (Esser et al., 2001; Ulugol et al., 2002; Wu et al., 2006). Toutefois, l'effet antalgique aigu de l'amitriptyline n'est pas altéré chez des souris déficientes pour le récepteur

de l'adénosine A1 suite à une douleur inflammatoire (test à la formaline) (Sawynok et al., 2008), suggérant que ces récepteurs ne seraient pas nécessaires à l'effet thérapeutique des antidépresseurs. Le rôle éventuel de l'adénosine dans l'action des antidépresseurs reste tout de même à confirmer par d'autres études expérimentales.

De nombreux aspects de la transmission GABAergique ont été étudiés dans des modèles animaux de douleur neuropathique, et un déficit de la transmission GABAergique a notamment pu être démontré (Moore et al., 2002; Drew et al., 2004; McCarson et al., 2005). En condition neuropathique, l'administration prolongée d'ATC augmente l'expression génique du récepteur GABA_B dans la moelle épinière, ce qui permettrait de restaurer la transmission GABAergique inhibitrice spinale (McCarson et al., 2005). De plus, l'effet antalgique d'une administration aiguë d'imipramine est bloqué par un antagoniste spécifique du récepteur GABA_B (Zarrindast et al., 2000).

Les données de littérature ne permettent finalement pas de définir un mécanisme d'action précis des antidépresseurs dans la douleur neuropathique. Les différences observées sont dues à la variabilité des questions scientifiques posées dans les différentes études. Ceci se traduit expérimentalement par des modèles animaux, des choix d'antidépresseurs et des modes (aigu versus prolongé) ou des sites (périphérique versus central) d'administration des antidépresseurs différents, l'ensemble des résultats devient alors difficile à synthétiser. Malgré tout, dans le cas d'un traitement prolongé, nous pouvons distinguer une action directe impliquant le plus souvent l'inhibition de la recapture des monoamines et une action indirecte par recrutement d'effecteurs secondaires en aval, qui refléterait des phénomènes de plasticité. Ces changements secondaires pourraient alors être une explication possible de la nécessité d'un délai thérapeutique.

4. Traitement par les antidépresseurs : Rôle particulier des récepteurs β_2 -adrénergiques

L'inhibition de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline constitue la cible première du mécanisme d'action des antidépresseurs. Aux plans clinique et préclinique, il a été démontré que l'administration prolongée d'IRS reste peu efficace dans le traitement de la douleur neuropathique (Max et al., 1992; Saarto and Wiffen, 2007; Benbouzid et al., 2008a; Attal et al., 2010). Ainsi la composante noradrénergique des ATC ou des IRSN jouerait un rôle primordial dans leur efficacité thérapeutique.

	ATC		IRSN	IRN
	Nortriptyline	Désipramine	Venlafaxine	Reboxétine
Antagoniste de récepteurs adrénergiques				
α 2-AR	Ø	Ø	Ø	Ø
β -AR	-			
β 1/ β 2-AR	-			
β 1-AR	Ø			
β 2-AR	-	-	-	-
β 3-AR	Ø			
Souris déficientes pour un récepteur adrénergique				
β 2-AR	-	-	-	

Tableau D3. Approches pharmacologique et génétique pour l'étude de l'action antiallodynique des antidépresseurs.

La modulation négative des récepteurs adrénergiques abolit (-) ou n'a pas d'effet (Ø) sur l'effet antiallodynique des antidépresseurs dans un modèle de douleur neuropathique.

Quels récepteurs de la neurotransmission noradrénergique sont impliqués dans l'effet thérapeutique des antidépresseurs ? En condition neuropathique, une augmentation de l'expression des récepteurs adrénergiques $\alpha_1(b)$ -, $\alpha_2(a)$ -, $\alpha_2(d)$ - et β_2 -AR a été constatée dans les ganglions rachidiens lombaires suite à une lésion du nerf sciatique (Maruo et al., 2006) ou uniquement celle du β_2 -AR lors d'une lésion du nerf optique (Mantyh et al., 1995). L'hypothèse la plus simple serait de considérer l'implication des α_2 -AR. En effet, ceux-ci sont exprimés dans le système nociceptif et participent aux contrôles inhibiteurs descendants de la nociception. Leurs agonistes, comme la clonidine ou la xylazine, sont très largement utilisés cliniquement dans la prise en charge de la douleur péri-chirurgicale. Cependant, dans un modèle de douleur neuropathique, la coadministration d'un antagoniste des récepteurs α_2 -AR, la yohimbine, n'a pas eu d'influence sur l'effet antiallodynique d'une administration prolongée d'un ATC (Yalcin et al., 2009b), d'un IRSN ou d'un IRN (Yalcin et al., 2009a). Par contre, un antagoniste des β -AR supprime complètement l'action antalgique de ces antidépresseurs (Yalcin et al., 2009b; Yalcin et al., 2009a). Ainsi cet effet thérapeutique semble être β -dépendant et non α -dépendant (**Tableau D3**). Ces β -AR sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés positivement à la voie de l'AMP cyclique par la protéine G stimulatrice. Ils sont subdivisés en trois sous-types. Des études pharmacologiques ont permis de définir les récepteurs β_2 -AR comme nécessaires à l'effet antiallodynique des antidépresseurs (Yalcin et al., 2009b; Yalcin et al., 2009a). En effet, un antagoniste non sélectif des β -AR, un antagoniste sélectif β_1/β_2 ou un antagoniste sélectif des β_2 -AR abolissent totalement l'effet thérapeutique d'un ATC (Yalcin et al., 2009b). Par contre, un antagoniste des β_1 - ou β_3 -AR n'affecte pas l'action antalgique de l'antidépresseur. Ce rôle indispensable des β_2 -AR a également été confirmé pharmacologiquement chez d'autres catégories d'antidépresseurs comme les IRSN ou IRN, mais aussi génétiquement en utilisant une lignée de souris déficientes pour le β_2 -AR (Yalcin et al., 2009b; Yalcin et al., 2009a). De plus, l'administration locale d'un antagoniste β_2 -AR a ainsi démontré que la localisation de l'action de ces récepteurs n'était pas supraspinale (Yalcin et al., 2009b). Ces données obtenues dans un modèle de douleur neuropathique peuvent laisser entrevoir une certaine potentialité thérapeutique dans l'utilisation d'un agoniste β_2 -AR. En effet, si la stimulation du β_2 -AR est primordiale pour conduire à une action antiallodynique des antidépresseurs, sa seule stimulation pourrait peut-être être suffisante pour obtenir le même effet thérapeutique. Cette hypothèse est validée dans un modèle animal de douleur neuropathique en montrant que divers β -mimétiques présentent le même effet antalgique que les antidépresseurs suite à une administration prolongée mais pas aiguë (Barrot et al., 2009; Choucair-Jaafar et al., 2009;

Yalcin et al., 2010). De façon intéressante, l'efficacité de ces β -mimétiques est constatée pour des doses qui semblent compatibles avec celles déjà utilisées en clinique pour d'autres pathologies comme l'asthme. L'aboutissement de ces travaux expérimentaux a été concrétisé par la publication d'une étude clinique, rapportant six cas de patients douloureux neuropathiques d'étiologie variée et résistants aux traitements usuels. La prise en charge thérapeutique de la douleur neuropathique réalisée par l'administration prolongée d'un agoniste β_2 -AR a conduit à une diminution nette des symptômes neuropathiques (Cok et al., 2010). Le peu d'effets secondaires de ces molécules présente un avantage majeur comparativement aux antidépresseurs et notamment les ATC.

Par contre, des études cliniques ont proposé, à l'inverse, l'utilisation d'antagonistes β_2 -AR pour la prise en charge de douleurs musculo-squelettiques, dont la fibromyalgie (Wood et al., 2005; Light et al., 2009). En effet, chez certains de ces patients, en plus d'une altération de l'activité du système nerveux sympathique, un polymorphisme de la Catéchol-O-Méthyl Transférase (COMT), enzyme clé de la dégradation des catécholamines, a été associé à une augmentation de la sensibilité douloureuse au travers d'une activation des β -AR recrutés par l'augmentation des taux de catécholamines (Gursoy et al., 2003; Diatchenko et al., 2006; Nackley et al., 2007). Malgré cela, le polymorphisme de la COMT n'a pas été relié directement à une prédisposition individuelle à développer une douleur neuropathique, ceci suggérant que la douleur musculo-squelettique chronique et la douleur neuropathique sont dictées par des mécanismes physiopathologiques distincts (Armero et al., 2005).

E. Objectifs du doctorat

Les recommandations cliniques mentionnent les antidépresseurs, plus particulièrement les ATC ou les IRSN comme première ligne de traitement de la douleur neuropathique. Cependant le mécanisme précis par lequel ils soulagent la douleur neuropathique reste peu connu. L'objectif de ce travail a été d'étudier ce mécanisme dans un modèle murin de douleur neuropathique. Les travaux antérieurs du laboratoire ont montré qu'un traitement prolongé, mais pas aigu par un ATC (nortriptyline) ou un β_2 -mimétique (terbutaline) et débutant 15 jours après l'induction de la neuropathie, supprimait l'allodynie mécanique en une douzaine de jours. De plus, ces études ont démontré l'implication de la composante noradrénergique et du système opioïdergique dans l'action antiallodynique des antidépresseurs.

La **première partie** de ce travail eut pour but de **localiser** l'action thérapeutique des antidépresseurs et des β_2 -mimétiques et de mettre en évidence le(s) **mécanisme(s) moléculaire(s)** par le(s)quel(s) ils exerceraient leur effet thérapeutique contre la douleur neuropathique.

Pour cela, nous nous sommes basés sur des résultats de l'équipe, indiquant que l'action antiallodynique d'un antidépresseur était supprimée par une administration intrathécale, mais pas intracérébroventriculaire, d'un antagoniste β_2 -AR. Ceci suggérait que l'action thérapeutique se situait dans la moelle épinière ou dans les ganglions rachidiens. Nous avons réalisé des lésions noradrénergiques centrales et/ou périphériques à l'aide d'une toxine, la guanéthidine, détruisant spécifiquement les neurones noradrénergiques. Pour compléter ce travail, nous avons déterminé le type cellulaire impliqué dans l'action thérapeutique des antidépresseurs. Ainsi des expériences d'imagerie calcique et de PCR en cellule unique ont été réalisées sur des cultures de cellules ganglionnaires de souris.

Après avoir déterminé la localisation tissulaire et cellulaire de l'effet thérapeutique des antidépresseurs et des β_2 -mimétiques, nous nous sommes intéressés au mécanisme moléculaire. Pour cela, nous avons étudié les modifications d'expression génique lors d'une neuropathie à long terme et lors de son traitement par un ATC ou un β_2 -mimétique. Enfin, les données obtenues à l'issue de ce criblage ont été confirmées par la technique de Western Blot.

Cette partie du travail de thèse a donné lieu à une revue sur les cytokines dans la douleur neuropathique (cf. introduction page 30) et à l'écriture d'un article sur le mécanisme antiallodynique des antidépresseurs.

REVIEW : Bohren Y, Yalcin I, Freund-Mercier MJ, Tessier LH and Barrot M. *Cytokines in neuropathic pain: from physiopathology to therapeutic targets. British Journal of Pharmacology*, 2011, soumis.

ARTICLE I : Bohren Y, Tessier LH, Petitjean H, Daniel D, Hugel S, Hein L, Schlichter R, Freund Mercier MJ, Yalcin I, Barrot M. *Antidepressant drug relieves neuropathic pain by a peripheral β_2 -adrenoceptor mediated anti-TNF- α mechanism in mouse model.* (en écriture)

La **seconde partie** de ce travail fut d'étudier l'implication des récepteurs opioïdes dans l'effet antiallodynique des antidépresseurs et des β_2 -mimétiques. Des études réalisées au laboratoire avaient démontré le rôle des DOR dans l'action d'un ATC. Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé trois lignées de souris déficientes pour les récepteurs aux opioïdes pour évaluer le rôle des MOR et des KOR dans l'action d'un ATC et des MOR, KOR ou DOR dans l'action d'un β_2 -mimétique.

Cette partie du travail de thèse a donné lieu à un article sur le rôle des MOR dans l'action de la nortriptyline et devrait donner lieu à une « brief communication » sur le rôle des KOR dans l'action d'un ATC et à un article sur celui des récepteurs opioïdes dans l'action antiallodynique d'un β_2 -mimétique.

ARTICLE II : Bohren Y, Karavelic D, Tessier LH, Yalcin I, Gavériaux-Ruff C, Kieffer BL, Freund- Mercier MJ, Barrot M. *Mu-opioid receptors are not necessary for nortriptyline treatment of neuropathic allodynia. European Journal of Pain*, 2010, 14:700-704.

RESULTATS

A. Mécanisme d'action des antidépresseurs tricycliques et des β_2 -mimétiques contre l'allodynie neuropathique

La douleur neuropathique est consécutive à une lésion ou une maladie affectant le système somatosensoriel. Sa prise en charge thérapeutique inclut les antidépresseurs tricycliques (ATC) comme une des premières lignes de traitement. Cependant, leur mécanisme d'action reste incompris. Des études précédentes ont montré que dans un modèle murin de douleur neuropathique, un traitement prolongé avec un antidépresseur supprime l'allodynie mécanique. Cet effet antiallodynique des ATC s'exerce à travers la stimulation indirecte des β_2 -AR et la seule stimulation par un agoniste β_2 -AR a le même effet antiallodynique qu'un traitement aux antidépresseurs. Dans cette étude, nous avons localisé l'action thérapeutique des ATC et étudié le rôle d'éléments neuroinflammatoires dans leur action sur la douleur neuropathique. Chez la souris, la douleur neuropathique est induite par la pose d'un manchon de polyéthylène autour de la branche principale du nerf sciatique droit, ce qui entraîne une allodynie mécanique ipsilatérale et persistante. Des lésions noradrénergiques périphériques et/ou centrales nous ont permis de mettre en évidence le site d'action des ATC au niveau périphérique. En outre, la combinaison de techniques de PCR sur cellule unique et d'imagerie calcique a montré que les β_2 -AR sont présents sur des cellules non neuronales des ganglions rachidiens. Nous avons ensuite recherché les modifications d'expression génique et protéique dans les ganglions rachidiens lors d'une neuropathie à long terme et de son traitement par la nortriptyline. Dans la neuropathie, nous mettons en évidence une augmentation de l'expression du TNF- α qui est corrigée par un traitement aux ATC. Ces résultats nous ont amené à traiter des souris neuropathiques par une stratégie « anti-TNF- α » utilisant l'etanercept. Un effet thérapeutique de cette molécule après douze jours de traitement est ainsi mis en évidence. En conclusion, ces résultats suggèrent que l'effet antiallodynique des ATC en traitement prolongé sur une neuropathie périphérique installée se localise en périphérie, recrutant les β_2 -AR des cellules non neuronales du ganglion rachidien. Cet effet mettrait notamment en jeu des régulations géniques de la voie NF κ B affectant l'expression du TNF- α .

Antidepressant drug relieves neuropathic pain by a peripheral β_2 -adrenoceptor mediated anti-TNF- α mechanism in mouse model

Yohann Bohren ^{1,2}, Luc-Henri Tessier ¹, Hugues Petitjean ^{1,2}, Dorothée Daniel ¹, Sylvain Hugel ¹, Lutz Hein ², Rémy Schlichter ^{1,2}, Marie-José Freund-Mercier ^{1,2}, Ipek Yalcin ^{1*} and Michel Barrot ^{1*}.

¹Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique, Strasbourg, France. ² Université de Strasbourg, Strasbourg, France. ³ University of Freiburg, Germany. * Both authors contributed equally to this work.

Corresponding author: Dr. Michel Barrot; Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Département Nociception et Douleur, 21 rue Descartes, 67084 Strasbourg, France. E-mail: mbarrot@inci-cnrs.unistra.fr

Key words: neuropathic pain; antidepressant; β_2 -adrenoceptor; mechanical allodynia; TNF- α ; mice

Abstract

Tricyclic antidepressants (TCA) are one of the first-line pharmacological treatments against neuropathic pain. Noradrenalin recruited by their action on reuptake transporters, has been proposed to act through β_2 -AR to lead to the antiallodynic action. However, the precise downstream mechanism leading to this therapeutic action remains to identify. In this study, we demonstrated in a mouse model of neuropathic pain that the antiallodynic effect of TCA implies the peripheral nervous system. More particularly, TCA-recruited noradrenaline acts, within dorsal root ganglia, on β_2 -AR which are expressed by non neuronal cells. This β_2 -AR stimulation leads to a decrease of membrane-bound TNF- α production by the NF κ B pathway repression, which is correlated to the measured antiallodynic effect. Our findings suggest that TCA act by a peripheral β_2 -AR-dependent mechanism targeting TNF- α -containing non neuronal cells, which prevents maintenance of neuropathic pain and may offer novel opportunities for management of painful neuropathies.

Abbreviations

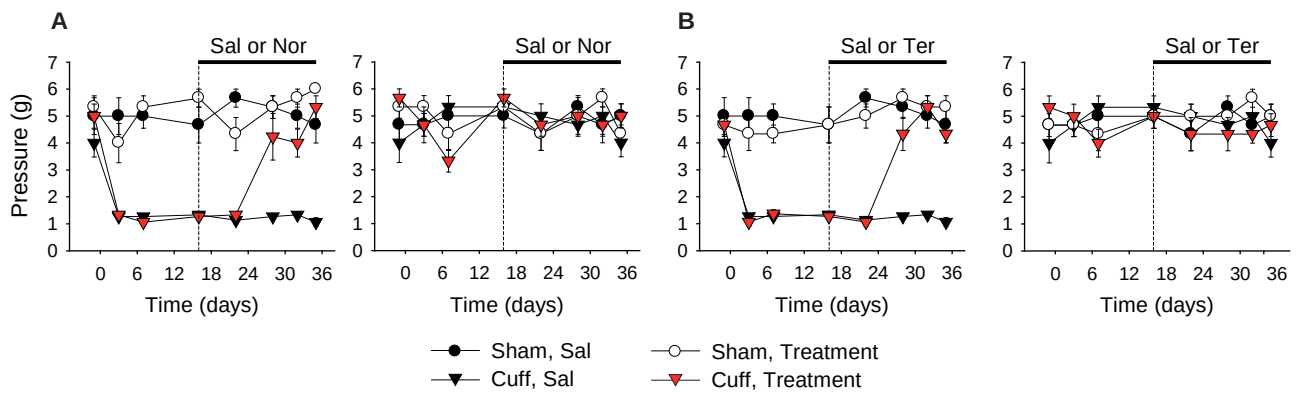
TCA:	tricyclic antidepressant drugs
SNRI :	serotonin- and noradrenaline-reuptake inhibitors
FDA:	food and drug administration
β -AR :	β -adrenergic receptor or β -adrenoceptor
IL :	interleukin
TNF- α :	tumor necrosis factor α
TNFR1 :	TNF- α receptor 1
NF κ B:	nuclear factor-kappa B
DRG :	dorsal root ganglia
TH :	tyrosine hydroxylase
PCR :	polymerase chain reaction
RT-PCR :	reverse transcriptase polymerase chain reaction
mRNA :	messenger ribonucleic acid
NF200 :	neurofilament-200
GS :	glutamine synthetase
KCL :	potassium chloride
ATP :	adenosine triphosphate
Cox-2 :	cyclooxygenase 2
ELISA :	Enzyme linked immunosorbent assay
PDTC :	pyrrolidine dithiocarbamate
CNS :	central nervous system
PNS :	peripheral nervous system
TACE :	TNF- α converting enzyme
CCI :	chronic constriction injury
GFAP :	glial fibrillary acidic protein
LPS :	lipopolysaccharides
cAMP :	cyclic adenosine monophosphate
PKA :	protein kinase A
NaCl :	sodium chloride
PBS :	phosphate buffer saline
EDTA :	ethylene diamine tetraacetic acid
MEM α :	minimum essential medium alpha
MgCl ₂ :	magnesium chloride
CaCl ₂ :	calcium chloride
EGTA :	ethylene glycol tetraacetic acid
GS :	glutamine synthetase
cDNA :	complementary deoxyribonucleic acid
SDS :	sodium dodecyl sulfate
PVDF :	polyvinylidene fluoride
HRP :	horse radish peroxidase
ARBP :	acidic ribosomal phosphoprotein P0

Introduction

Neuropathic pain is defined as a chronic pain resulting from a direct consequence of a lesion or disease affecting the somatosensory system (Loeser and Treede, 2008). Clinical management of neuropathic pain is a real challenge due to our limited understanding of the cellular mechanisms that initiate and maintain neuropathic pain. However, tricyclic antidepressant drugs (TCA), which act by blocking monoamines uptake sites, are clinically recommended as first-line drugs for chronic treatment of neuropathic pain (Attal et al., 2006; Dworkin et al., 2007; Moulin et al., 2007). Even if TCA still remain the most prescribed antidepressant drugs against neuropathic pain, other dual-acting molecules designed as serotonin- and noradrenaline-reuptake inhibitors (SNRI) were also demonstrated to be effective and were approved by FDA in neuropathic pain treatment (Saarto and Wiffen, 2007; Finnerup et al., 2010). Based on clinical and preclinical studies, specific serotonin reuptake inhibitors are less efficient than SNRI or TCA to alleviate neuropathic pain (Attal et al., 2006; Dworkin et al., 2007; Benbouzid et al., 2008a; Finnerup et al., 2010), this suggests that the noradrenergic component of TCA may play a critical role in their action. Moreover, a chronic, but not acute, treatment with antidepressant drug is necessary to obtain a therapeutic effect against neuropathic pain (Mico et al., 2006; Benbouzid et al., 2008a; Yalcin et al., 2009a), suggesting the recruitment of an indirect mechanism. If therapeutic effect of antidepressant drug is well documented, the precise mechanism by which neuropathic pain is alleviated stays poorly understood.

To determine the neuroanatomical substrate of antidepressant drug action, potential sources of endogenous noradrenaline must be studied. Indeed, noradrenaline can be released within supraspinal structures (El Mansari et al., 2010), at spinal level by descending noradrenergic inhibitory controls (Yoshimura and Furue, 2006) or at peripheral level in dorsal root ganglia following a pathological noradrenergic sprouting of sympathetic nervous system (Ramer and Bisby, 1998). Previous preclinical studies using β -adrenergic receptor antagonists, suggested that the antiallodynic action of either antidepressant drugs or β -mimetics might be localized at spinal cord or peripheral levels rather than at supraspinal level (Choucair-Jaafar et al., 2009; Yalcin et al., 2009b).

Beyond location of antidepressant drugs action, another question relates to the cascade of events leading to the therapeutic effect of antidepressant drugs. Preclinical pharmacological and genetic approaches suggested that antidepressant-recruited noradrenaline acts through β_2 -



Supplemental figure A1. Nortriptyline and terbutaline treatment of neuropathic allodynia.

Two weeks after cuff implantation, the daily treatment with nortriptyline (5 mg/kg, i.p. twice a day), terbutaline (0.5 mg/kg, i.p. twice a day) or their saline control (0.9 % NaCl) started and was maintained for 3 weeks. The hindpaw mechanical threshold was tested before the morning drug injection, using von Frey filaments. (A) Nortriptyline treatment did not affect the mechanical threshold of the contralateral paw, but chronic nortriptyline suppressed the ipsilateral cuff-induced allodynia. (B) Similar results were observed with terbutaline treatment. (n=6 for the different Sham groups, n=6-7 for the different Cuff groups). Data are expressed in mean $\pm$ SEM.

adrenoceptors (β_2 -AR), but not α_2 -, β_1 - or β_3 -AR, to relieve neuropathic allodynia (Yalcin et al., 2009b; Yalcin et al., 2009a). It is established that β_2 -adrenoceptor agonists have no acute intrinsic analgesic property, but a chronic direct stimulation of these receptors by β_2 -AR agonists can result in the same therapeutic effect than TCA or SNRI treatments (Choucair-Jaafar et al., 2009; Yalcin et al., 2010). Preliminary clinical study appears to support this therapeutic potential of β_2 -mimetic against neuropathic pain (Cok et al., 2010).

If β_2 -AR seems primordial in the therapeutic effect of TCA, the downstream mechanism is not clear. Among proposed hypothesis, a neuro-immune implication has been evoked (Mico et al., 2006). Indeed, it has been increasingly recognized that glial and/or immune cells play an important role in the development and/or maintenance of chronic pain, particularly by the recruitment of the cytokine system (Thacker et al., 2007; Leung and Cahill, 2010). Notably, clinical studies suggested that chronic neuropathic pain is often associated with an increased expression of pro-inflammatory cytokines. Indeed, increased levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α were observed from sural nerve biopsies of patients with sciatic neuropathic pain (Empl et al., 2001; Lindenlaub and Sommer, 2003).

We now demonstrate in a mouse model of neuropathic pain that the antiallodynic effect of TCA is located in peripheral nervous system. More particularly, TCA-recruited noradrenaline acts within dorsal root ganglia, on β_2 -AR which are expressed by non neuronal cells. This β_2 -AR stimulation leads to a decrease of membrane-bound TNF- α production by the NF κ B pathway repression, which is correlated to the measured antiallodynic effect.

Results

Sympathetic sprouting in DRG is essential to antiallodynic action of TCA.

We used chronic sciatic nerve cuffing in mice to mimic human neuropathy resulting from a trauma of peripheral nerves (Mosconi and Kruger, 1996; Benbouzid et al., 2008b). Mechanical allodynia is one of the symptoms which distresses the patients. In our model, it appeared on the first day and persisted over three months following sciatic nerve injury (Benbouzid et al., 2008b). This symptom is observed for the ipsilateral paw ($p < 0.05$) but not for the contralateral paw of nerve cuffing ($p > 0.05$) (**Supplemental Figure A1**). This allodynia was relieved by a chronic treatment with a TCA, nortriptyline, or a β_2 -AR agonist,

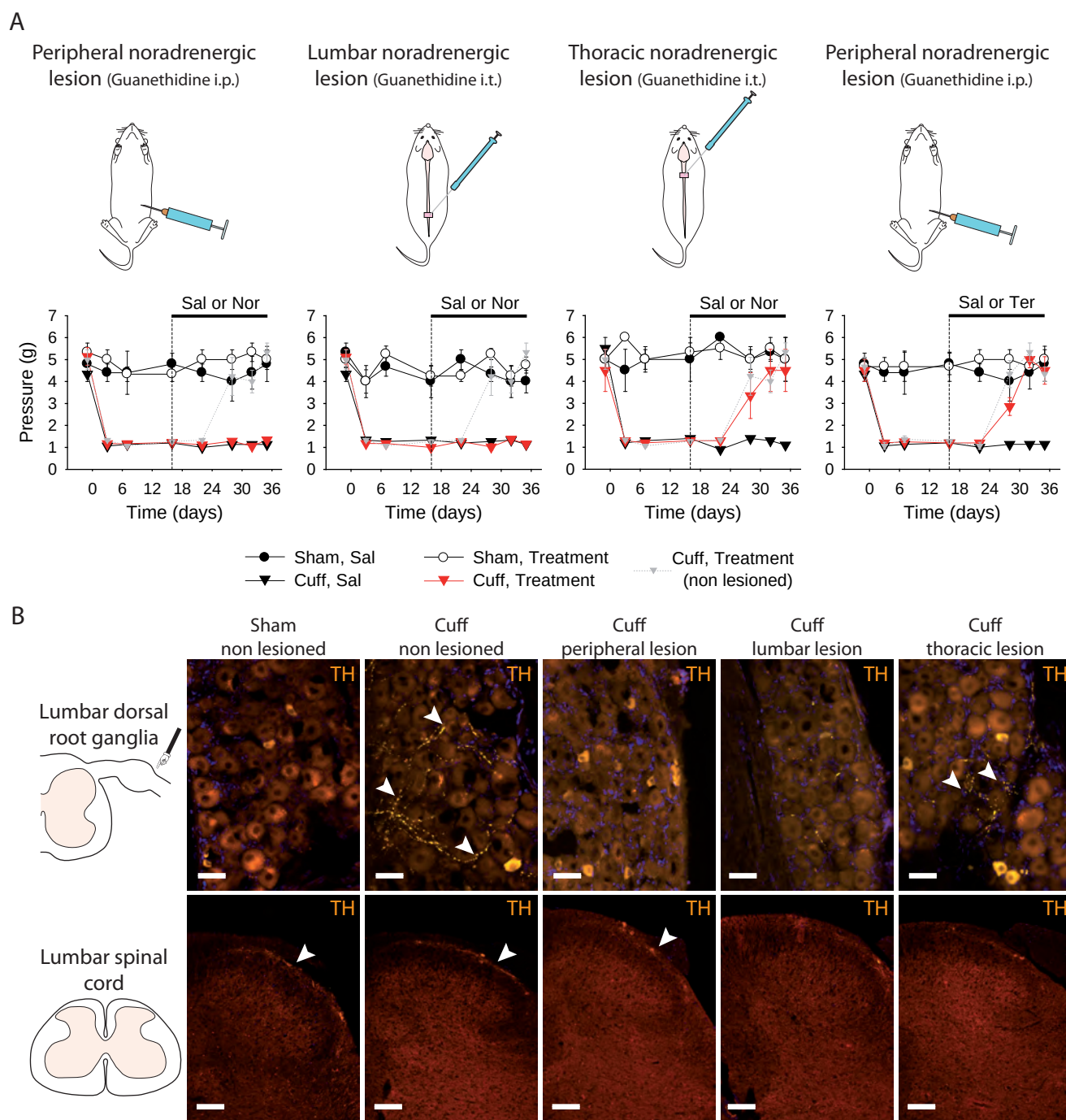


Figure A1. Consequences of noradrenergic lesions at different neuroanatomical sites on antiallodynic effect of TCA or β 2-mimetic treatment.

(A) Effect of chronic nortriptyline treatment on the hindpaw threshold in Sham and Cuff mice following a peripheral noradrenergic lesion ($p > 0.05$ compared to time point 0, repeated-measures ANOVA, Duncan's test), a lumbar intrathecal noradrenergic lesion ($p > 0.05$ compared to time point 0, repeated-measures ANOVA, Duncan's test) and a thoracic intrathecal noradrenergic lesion ($p < 0.001$ compared to time point 0, repeated-measures ANOVA, Duncan's test). Effect of chronic terbutaline treatment on mechanical threshold in Sham and Cuff mice following a peripheral noradrenergic lesion ($p < 0.001$ compared to time point 0, repeated-measures ANOVA, Duncan's test). Grey line on each graph represents the unlesioned reference condition (Cuff nortriptyline or terbutaline). Values are mean $\pm$ SEM of the right hind-paw withdrawal thresholds; $n = 6-9$ mice per group. (B) Representative immunostaining images showing expression of Tyrosine Hydroxylase (TH) in lumbar dorsal root ganglia and in spinal cord at 5 weeks after cuff implantation in different conditions: non lesioned Sham and Cuff mice; peripheral, lumbar intrathecal or thoracic intrathecal noradrenergic lesioned Cuff mice. Scale bars: 100 μ m.

terbutaline ($p < 0.05$, for the two treatments; **Supplemental Figure A1**). Since the preclinical and clinical data showed that the noradrenergic system is essential for the antiallodynic action of antidepressant drugs (Krell et al., 2005; Yalcin et al., 2009a), we aimed to investigate the possible source of endogenous noradrenaline which is used by antidepressant drugs to alleviate neuropathic pain.

For this purpose, noradrenergic lesions were done with a neurotoxin, guanethidine, two weeks before the induction of neuropathic pain. Independently of the lesion site, we observed that noradrenergic fibers depletion did not affect the threshold of mechanical sensitivity before or after the sciatic nerve cuffing surgery ($p > 0.05$, for all groups; **Figure A1 A**). The peripheral injection of guanethidine, which does not cross the brain blood barrier (Zochodne et al., 1989), prevented the antiallodynic action of nortriptyline ($p < 0.05$; **Figure A1 A**), but not of terbutaline (**Figure A1 A**). Similarly, local intrathecal depletion at the lumbar level prevented the therapeutic action of nortriptyline ($p < 0.05$; **Figure A1 A**). On the contrary, an intrathecal injection at thoracic level remained ineffective on the antiallodynic effect of the TCA treatment ($p > 0.05$; **Figure A1 A**).

These lesions were neuroanatomically confirmed by immunohistochemistry against Tyrosine Hydroxylase (TH) (**Figure A1 B**). As previously reported a noradrenergic sprouting was observed in neuropathic mice. Intrathecal injections may affect not only the spinal cord but also the closest dorsal root ganglia. Following a peripheral (sympathectomy) or a lumbar intrathecal administration of guanethidine, the TH immunoreactivity is mostly suppressed in the lumbar dorsal root ganglia (DRG) of cuff mice. On the contrary, the noradrenergic sprouting in lumbar DRG remains present after thoracic intrathecal lesion (**Figure A1 B**). In the spinal cord, the lumbar TH staining was not affected by the peripheral sympathectomy. However, a significant reduction of TH fibers was observed at lumbar spinal level following lumbar or thoracic intrathecal lesions (**Figure A1 B**). Together, these results suggest that the noradrenergic sprouting in dorsal root ganglia is critical for the antiallodynic action of TCA treatment.

β_2 -adrenergic receptors locate on non neuronal cells of DRG.

Antidepressants drugs-recruited noradrenaline acts on β_2 -AR to relieve neuropathic allodynia (Yalcin et al., 2009b; Yalcin et al., 2009a). We then aim to investigate the cell type expressing β_2 -AR in dorsal root ganglia. From dissociated DRG cell culture of naïve adult mice, we tried to determine by single cell PCR method which type of cells would express mRNA encoding

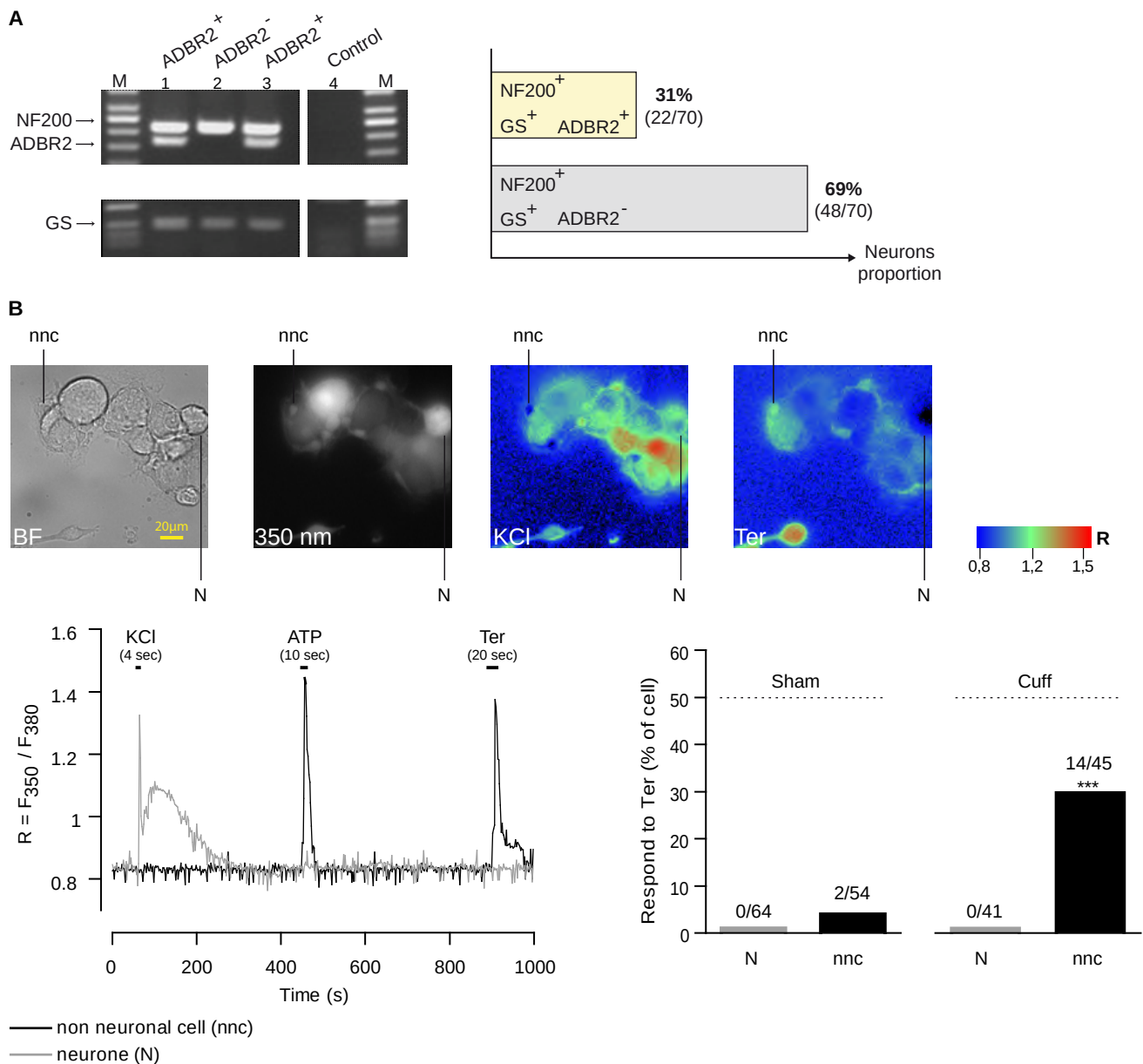


Figure A2. Analysis of β 2-AR cellular location in dissociated dorsal root ganglia culture.

(A) Single cell PCR analysis: a standard marker ladder is shown on lanes M. Lanes 1–3 illustrate amplified DNA products corresponding to NF200 mRNA, β 2-AR mRNA and GS mRNA from 3 independent freshly isolated cells. Lane 4 shows a negative control: RT-PCR on PCR buffer and patch clamp buffers (intrapipette buffer + perfusing solution). DNA products were resolved in a 1.2% agarose gel and visualized with ethidium bromide. (B) Calcium imaging analysis: a typical field is respectively presented in bright field (BF), at 350 nm fluorescence, after a KCl application of 4 seconds and after a terbutaline (Ter) application of 20 seconds. Typical examples of traces of calcium transients are represented as ratiometric change in fluorescence emission upon sequential excitation at 350 nm and 380 nm (F_{350}/F_{380}) during bath application of KCl (50 mM), ATP (50 μ M) or terbutaline (100 μ M). Last graph shows a summary of the fraction of Fura-2 positive DRG cells responding to terbutaline (expressed as a percentage of neuronal (N) or non neuronal (nnc) cells tested) over 9 to 10 independent culture experiments of Sham and Cuff mice. *** $P < 0.001$, exact Fischer's test.

β_2 -AR. NF200 neurofilament was used as neuronal marker (Ho and O'Leary, 2010) and glutamine synthetase (GS) as a marker of satellite glial cells in the DRG (Hanani, 2005). 31 % of tested cells appeared positive for β_2 -AR mRNA (**Figure A2 A**). Unfortunately, these cells were positive for both NF200 and GS, suggesting that DRG neurons could not be dissociated from their satellite cells. To solve this technical difficulty related to the satellites/neuron association, we used a more functional approach with calcium imaging in DRG cell culture. To determine which cell type expressed functional β_2 -AR on its membrane, KCl was used as a neuronal activator, ATP as a non neuronal cell activator and terbutaline as a specific β_2 -AR agonist. In sham mice, only some non neuronal cells, identified by a Ca^{2+} response to ATP, expressed functional β_2 -AR on their membrane (4%, **Figure A2 B**). On the contrary, in DRG from neuropathic animals, the proportion of non neuronal cells responding to terbutaline application increased to 31 %. (**Figure A2 B**). Thus, it appears that neuropathic pain induced an increased recruitment of β_2 -AR on non neuronal cells ($p < 0.05$; **Figure A2 B**). None of the neurones, identified by a Ca^{2+} response to KCl, responded to terbutaline application in sham or cuff mice (**Figure A2 B**).

These results suggest that functional β_2 -AR would be located on the membrane of satellite glial cells within DRG.

TCA or β_2 -AR agonist display anti-TNF- α action on DRG.

Glial and/or immune cells are recruited by the neuropathy and play a role in the development and the maintenance of neuropathic pain (Vallejo et al., 2010). With regards to these elements, we thus examined the role of neuroinflammatory actors in DRG and in the neuropathic pain treatment by TCA or β_2 -AR agonist.

A gene expression analysis of TNF- α , IL-10, Cox-2, IL-1 or IL-6 mRNA in DRG suggested a preferential role for TNF- α ($p < 0.05$; **Figure A3 A**). Indeed, TNF- α expression increased in neuropathic mice ($p < 0.05$; **Figure A3 A**), while a significant decrease was observed with nortriptyline treatment ($p < 0.05$; **Figure A3 A**). No significant changes were observed for the other inflammatory related genes Cox-2, IL-1 α , IL-1 β or IL-6. Interestingly, the anti-inflammatory cytokine IL-10 presented a trend to decrease in neuropathic condition with a return to baseline with nortriptyline treatment, but this trend was not statistically significant ($p = 0.12$; **Figure A3 A**).

To confirm mRNA expression results, changes in TNF- α protein were assessed in DRG of wild type (ADBR2^{+/+}) and β_2 -AR deficient (ADBR2^{-/-}) mice. Membrane-bound TNF- α

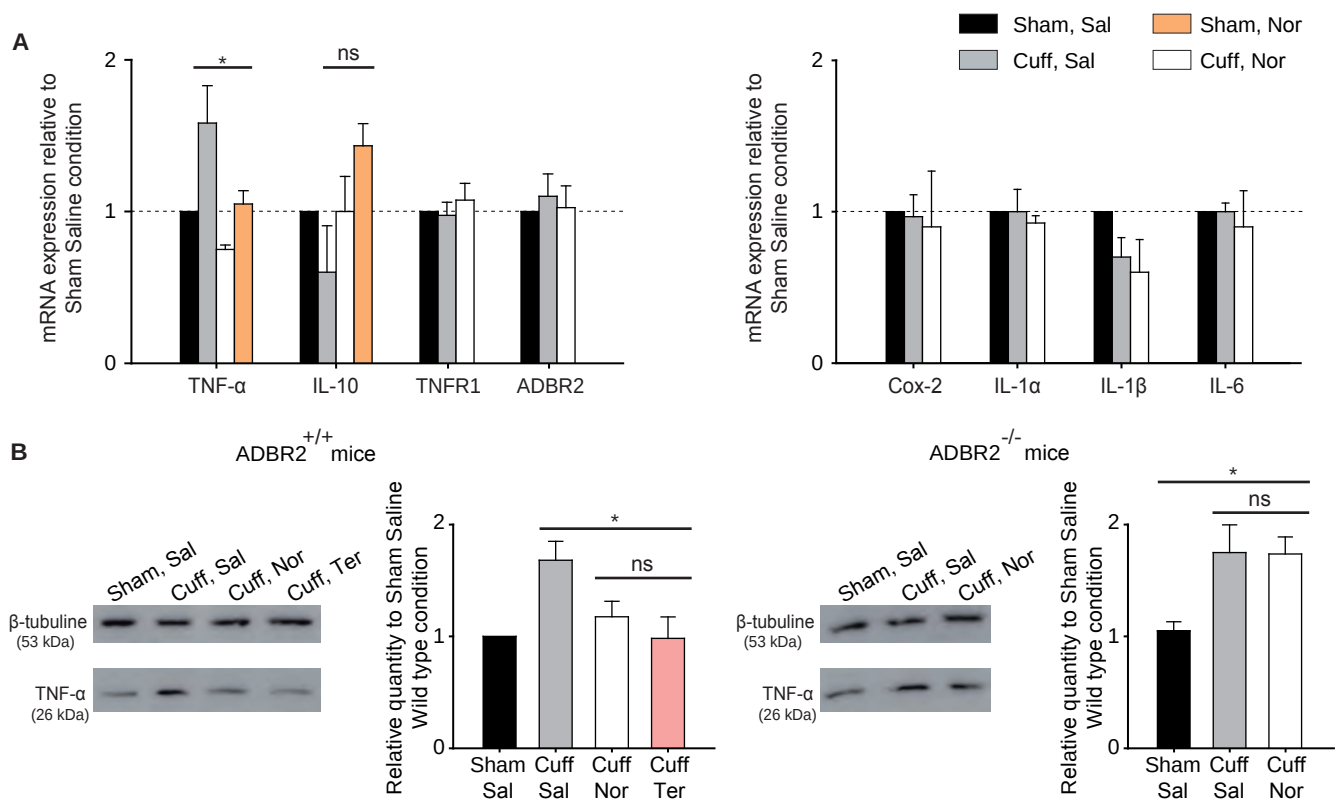


Figure A3. Effect of chronic nortriptyline or terbutaline on gene and protein expression studied in dorsal root ganglia of mice.

(A) The levels of each target gene mRNA and ARBP (housekeeping gene) were measured by real-time PCR in mouse DRG. Each group of column represents means $\pm$ standard error of the means of each tested condition (Cuff saline, Cuff nortriptyline or Sham nortriptyline; $n=4$ per condition) and for each target gene. Each condition is normalized using ARBP and is presented as a relative expression to Sham saline condition. TNF- α mRNA expression was significantly higher in saline-treated cuff mice than in nortriptyline-treated sham or cuff animals ($p<0.05$, Kruskal-Wallis ANOVA, Mann-Whitney U test). Reciprocally, TNF- α mRNA expression was significantly lower in nortriptyline-treated cuff mice than in saline-treated cuff or nortriptyline-treated sham animals ($p<0.05$, Kruskal-Wallis ANOVA, Mann-Whitney U test). (B) TNF- α and β -tubulin (housekeeping protein) protein expression were assessed by immunoblotting analysis in mouse dorsal root ganglia. Each column represents the mean $\pm$ SEM of each tested condition (Cuff saline, Cuff nortriptyline or Cuff terbutaline for ADBR2^{+/+} and ADBR2^{-/-} mice; $n=4$ per condition). Each condition is normalized using β -tubulin and is presented as a relative quantity to Sham saline ADBR2^{+/+} condition. TNF- α protein level was significantly increased in saline-treated ADBR2^{+/+} and ADBR2^{-/-} cuff mice and in nortriptyline-treated ADBR2^{-/-} cuff mice ($p<0.05$, Kruskal-Wallis ANOVA, Mann-Whitney U test). TNF- α protein level was not significantly different in nortriptyline or terbutaline-treated ADBR2^{+/+} cuff mice compared to sham mice ($p>0.05$, Kruskal-Wallis ANOVA, Mann-Whitney U test).

(mTNF- α) increased in neuropathic mice, which was corrected by either nortriptyline or terbutaline treatment ($p < 0.05$; **Figure A3 B**). In ADBR2^{-/-} mice, the neuropathy-induced increase in mTNF- α was no more corrected by the antidepressant treatment (**Figure A3 A**), which is in agreement with the lack of antiallodynic action in these mice (Yalcin et al., 2009b). Expression levels of TNF- α receptor 1 (TNFR1) was not affected by either the neuropathy or its treatment. While mTNF- α changed with neuropathic pain and its treatments, the soluble form of TNF- α remained undetectable in the DRG. We also assessed soluble TNF- α in serum by ELISA. No soluble TNF- α could be detected (data not shown). These results support a preferential role of mTNF- α in neuropathic pain (Zhou et al., 2010), and of mTNF- α as a downstream target of antidepressant drug action.

The loss of nortriptyline action on allodynia and mTNF- α expression in ADBR2^{-/-} mice, suggested that mTNF- α may be critical for both the pathophysiology and its treatment. Thus, we tested the influence of etanercept, an anti-TNF- α molecule that do not cross the brain blood barrier, on the maintenance of neuropathic pain in ADBR2^{+/+} and ADBR2^{-/-} mice. In both cases, etanercept suppressed the neuropathic allodynia after 10 days of treatment ($p < 0.05$; **Figure A4**), which is similar to antidepressant or β_2 -AR agonist action. These results suggest that, downstream of β_2 -AR, peripheral mTNF- α is sufficient to maintain neuropathic pain.

NF κ B-dependent production of TNF- α is necessary for the maintenance of neuropathic pain.

These results on mTNF- α are in agreement with the literature reporting a strong involvement of non neuronal cells and their cytokines production in the pathophysiology of neuropathic pain (Scholz and Woolf, 2007; Leung and Cahill, 2010). These preclinical data seem also clinically relevant as an increase in TNF- α immunoreactivity was observed on nerve biopsies from patients with neuropathy (Empl et al., 2001). In various cell types, TNF- α production has been linked to the activation of the NF κ B transduction pathway (Kaltschmidt and Kaltschmidt, 2009). In the present case, we observed no change in NF κ B mRNA or in the endogenous repressors I κ B α or I κ B β mRNA with the neuropathic condition (**Figure A5 A**). However, the nortriptyline treatment of neuropathic mice induced a significant increase in I κ B α mRNA (**Figure A5 A**). These finding suggest that TCA may decrease TNF- α production through the induction of a NF κ B pathway repressor. To behaviorally assess the relevance of this pathway for the neuropathic allodynia phenotype, mice were chronically treated with the

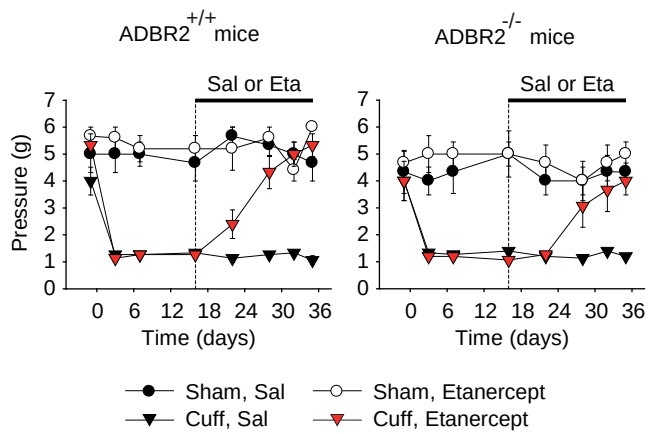


Figure A4. Effect of chronic etanercept treatment against on neuropathic allodynia in ADBR2^{+/+} and ADBR2^{-/-} mice.

Chronic etanercept (Eta) treatment suppressed the neuropathy-induced mechanical allodynia in both β 2-AR deficient mice and wild type littermates ($p < 0.001$ compared with 0 time point, repeated-measures ANOVA, Duncan's test). Values are means $\pm$ standard error of the means of the right hind-paw withdrawal thresholds; $n = 5-6$ mice per group.

NF κ B pathway inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC). This treatment was sufficient to relieve neuropathic allodynia after 12 days ($p < 0.05$; **Figure A5 B**), and to decrease TNF- α immunostaining in the DRG (**Figure A5 C**). These data indicate that NF κ B pathway is critical for both TNF- α overproduction and mechanical allodynia maintenance in neuropathic condition.

Discussion

The need to improve neuropathic pain therapies is important in regards to the efficacy and side effects of existing treatments. Thus, decrypting the precise mechanism of existing treatment may help improving these treatments or discovering new therapeutic targets. This study aimed at addressing this question by providing new insights into the mechanism by which antidepressant drugs alleviate neuropathic pain. We show that following sciatic nerve injury, the antiallodynic action of chronic antidepressant drug or β_2 -AR agonist treatments takes place in peripheral nervous system, more precisely in dorsal root ganglia. We also demonstrate that the β_2 -AR, responsible for the antiallodynic action of antidepressant drugs and β_2 -AR agonists, are expressed on satellite glial cells and that local TNF- α expression plays a critical role in the maintenance and treatment of neuropathic pain.

Noradrenaline is an important element in the antiallodynic action of antidepressant treatment. Previous studies showed that this therapeutic action can be blocked by lumbar intrathecal manipulations (Suzuki et al., 2008; Yalcin et al., 2009a). Thus, the most common hypothesis for the analgesic action of TCAs implicated the recruitment of noradrenergic descending pathways that inhibit nociceptive responses (Yoshimura and Furue, 2006). However, such intrathecal manipulations also affect the closest nearby dorsal root ganglia, making difficult to locally differentiate central from peripheral action. By directly comparing noradrenergic lesions at different levels of nervous system, our results privileged the dorsal root ganglia as the neuroanatomical substrate for antidepressant drug antiallodynic action. In this case the local source of noradrenaline would be provided by the sympathetic fibers sprouting in dorsal root ganglia that accompanies peripheral nerve injury (McLachlan et al., 1993).

The dorsal root ganglion is composed of pseudo-unipolar type neurons whose afferent axons relay sensory information into the central nervous system (CNS), and of non neuronal cells such as resident immune cells or satellite glial cells around the soma of neurons (Austin and Moalem-Taylor, 2011). β_2 -AR mRNA was previously detected in dorsal root ganglia (Maruo

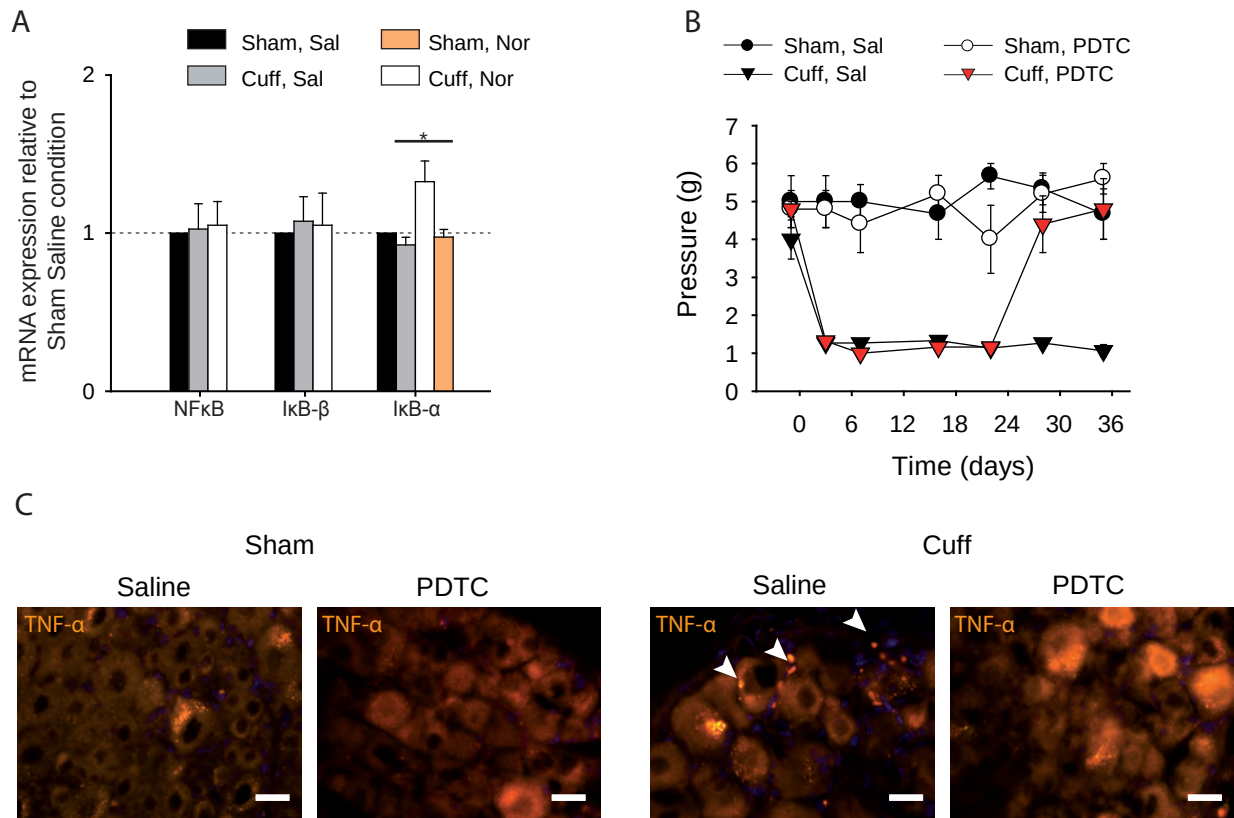


Figure A5. Implication of NFκB pathway in TNF-α production in mouse neuropathic pain model.

(A) The levels of target gene mRNA and ARBP (housekeeping gene) were measured by real-time PCR in mouse DRG. Each group of column represents means $\pm$ standard error of the means for each tested condition (Cuff saline, Cuff nortriptyline or Sham nortriptyline; $n=4$ per condition) and for each target gene. Each condition is normalized using ARBP and is presented as a relative expression to Sham saline condition. IκB-α mRNA expression was significantly higher in nortriptyline-treated cuff mice than in nortriptyline-treated sham or saline-treated cuff animals (* $p<0.05$, Kruskal-Wallis ANOVA, Mann-Whitney U test). (B) Chronic pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) treatment suppressed the neuropathy-induced mechanical allodynia in neuropathic mice ($p<0.001$ compared to time point 0, repeated-measures ANOVA, Duncan's test). Values are mean $\pm$ SEM of the right hind-paw withdrawal thresholds; $n = 5-6$ mice per group. (C) Representative immunostaining showing expression of TNF-α in lumbar dorsal root ganglia at 5 weeks in saline- or PDTC-treated sham mice and saline- or PDTC-treated cuff mice. Scale bars: 50 μ m.

et al., 2006). In our study, we found that these receptors are more precisely expressed on satellite glial cells. These cells are the peripheral analogue of CNS astrocytes (Trimmer et al., 1984) which are also known to express β_2 -AR on their membrane (Stone and John, 1990; Mantyh et al., 1995) in various species including human (Mantyh et al., 1995). Moreover, it appears that the functionality of these receptors is even increased under neuropathic condition, as revealed by the calcium imaging data.

Recent data indicate that neuropathic pain may partly be considered as a neuro-immune disorder, with a critical involvement of glial and/or immune cells following nerve injury (Austin and Moalem-Taylor, 2011). This cells activation at the lesion site or in dorsal root ganglia for the peripheral nervous system (PNS) or in the spinal cord or in supraspinal structures for the CNS results in the recruitment of cytokines system (White et al., 2009; Austin and Moalem-Taylor, 2011). Pro-inflammatory cytokines produced in the PNS after injury participated to the physiopathology of neuropathic pain (Wagner and Myers, 1996; Sommer et al., 2001b; Leung and Cahill, 2010). In installed neuropathic pain, some cytokines such as TNF- α still display enhanced expression. This expression appears relevant to the pathological situation, as direct or indirect blockade of TNF- α synthesis or action can relieve neuropathic pain symptoms both in animals (Sommer et al., 2001a) (present results) and in humans (Tobinick and Davoodifar, 2004; Korhonen et al., 2005). Our results suggest that antidepressant drugs would act through an indirect β_2 -AR mediated anti-TNF- α mechanism to relieve neuropathic allodynia.

TNF- α is primarily membrane-bound (mTNF- α , 26 kDa), and this mTNF- α is cleaved by the TNF- α converting enzyme (TACE) to release the soluble peptide (sTNF- α , 17kDa). The diffusible sTNF- α is the most studied form of TNF- α . However, mTNF- α is also biologically active as self-assembling non-covalent bound trimers (Hehlhans and Pfeffer, 2005). After chronic neuropathy, we did not detect sTNF- α in the serum or in dorsal root ganglia, but we found a significant increase of mTNF- α within the dorsal root ganglia. This selective recruitment of mTNF- α in neuropathic pain has also been observed in the spinal cord (Peng et al., 2006; Hao et al., 2007), where it is produced by glial cells (Zhou et al., 2010). In the dorsal root ganglia, we may hypothesize that the mTNF- α produced by non neuronal cells would participate to neuropathic allodynia by influencing the nearby nociceptors, through a local cell-cell signaling communication. Moreover, this local mTNF- α recruitment by the neuropathic condition should not be confounded with the classical inflammatory cascade. Indeed, neither IL-1 nor IL-6 is implicated (present data) and the inhibition of the

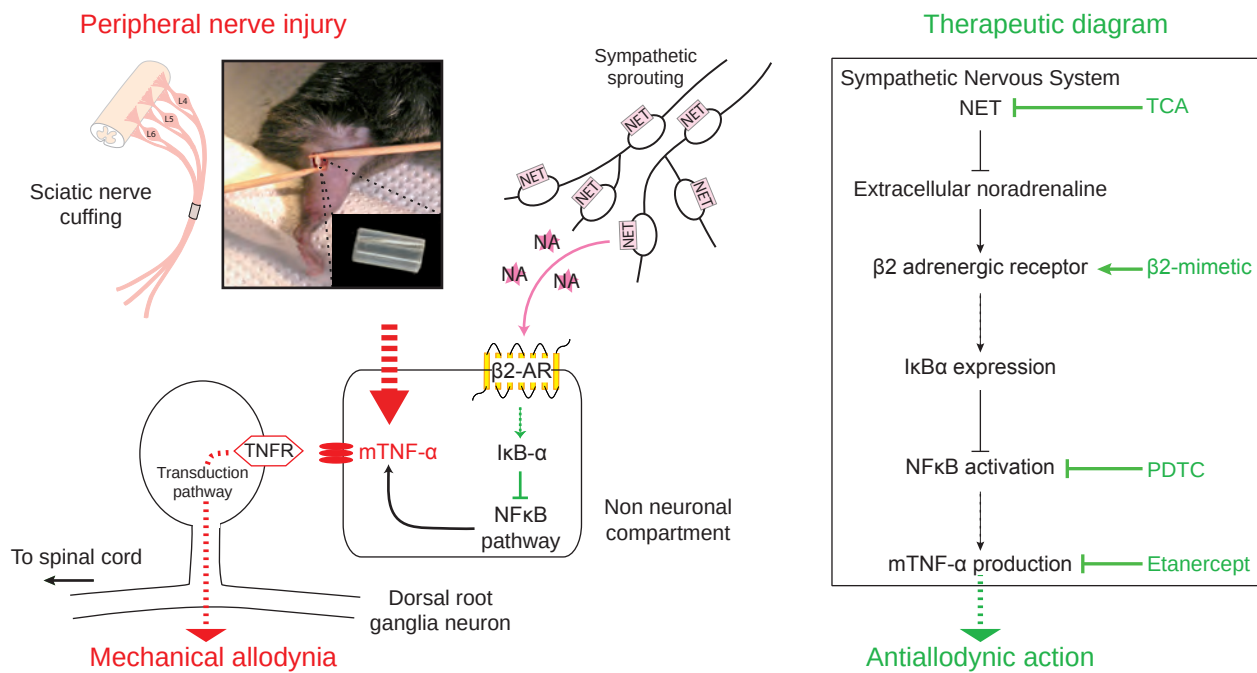


Figure A6. Summary of the action mechanism responsible for antidepressant drug relief of neuropathic allodynia in a mouse model.

Following sciatic nerve injury, a pathological noradrenergic sprouting is observed in dorsal root ganglia which contain nociceptive neurons and their glial cells (satellite glial and Schwann cells). Chronic TCA treatment inhibits noradrenaline reuptake in sympathetic varicosities, thus locally increasing noradrenaline levels. Noradrenaline or $\beta 2$ -mimetic stimulate the $\beta 2$ -AR expressed on non neuronal cells membranes. This $\beta 2$ -AR recruitment favours the downstream production of NFkB endogenous repressor expression IkB- α , which would lead to decreased TNF- α production. Accordingly, neuropathic pain may be alleviated by direct stimulation of $\beta 2$ -AR ($\beta 2$ -mimetic), by blocking the NFkB pathway (PDTC), or by blocking directly TNF- α (etanercept).

inflammatory cascade through Cox-2 targeting has no antiallodynic action (Benbouzid et al., 2008a).

NF- κ B pathway may play a key role in the regulated production of pro-inflammatory cytokines and immune or glial responses (Makarov, 2000), and intrathecal injection of NF- κ B antisense significantly attenuate mechanical allodynia (Sun et al., 2006). Moreover, following nerve injury, the expression of TNF- α in dorsal root ganglia and neuropathic behaviors are reduced in transgenic mice with I κ B α overexpression in glial cells (Fu et al., 2010). We show that I κ B α expression is not affected by the neuropathic condition, but is recruited by antidepressant drug treatment; and that chronic treatment with the NF- κ B pathway inhibitor PDTC reduces TNF- α expression and suppresses neuropathic allodynia. Thus, this I κ B α recruitment provides a molecular substrate through which the treatment may inhibit mTNF- α production and relieves neuropathic pain symptoms. The noradrenaline, at the start point of this therapeutic cascade, originates from sympathetic fibers sprouting in the dorsal root ganglia. Interestingly, the sympathetic nervous system has also been shown to be a potent regulator of TNF- α production after lipopolysaccharides (LPS) exposure (Elenkov et al., 1995; Hasko et al., 1995; Szelenyi et al., 2000). In LPS-induced inflammation, noradrenaline from sympathetic nervous system or β -AR agonists inhibit the production of TNF- α by immune and glial cells (Hetier et al., 1991; Severn et al., 1992; van der Poll et al., 1994; Nakamura et al., 1998), and this modulatory effect may be mediated *via* β_2 -AR (Elenkov et al., 1995). Stimulation of these receptors increases intracellular cAMP levels (Fedyk et al., 1996), which can lead to NF- κ B pathway inhibition (Elenkov et al., 2000). Our results support the idea that antidepressant drugs would act on neuropathic allodynia to a similar cascade of events (**Figure A6**).

In conclusion, this study highlights a novel mechanistic substrate for antidepressant drug action against neuropathic pain. By recruiting noradrenaline from sprouting sympathetic fibers in the dorsal root ganglia, antidepressant drugs stimulate local β_2 -AR on non neuronal cells. Through potential inhibition of the NF- κ B pathway, this action decreases mTNF- α production and leads to the antiallodynic effect. This finding is an important step to understand the mechanism by which antidepressants or β_2 -mimetic relieve this neurological condition. Our data obtained in a mouse model suggest that directly or indirectly targeting TNF- α effect or production may potentially offer alternative therapeutic approaches to antidepressant drugs for neuropathic pain management. It is important to note that this study was conducted in an animal model. It will now require a clinical validation. Such future

validation will also be critical to confirm the value of this model for translational research on neuropathic pain and its treatment.

Methods

Animals

The experiments were done using male C57Bl/6J mice (Charles River, L'Arbresle, France). The mice lacking β_2 -ARs were created in the laboratory of Brian Kobilka (Stanford University, Stanford, CA) and have been described previously (Chruscinski et al., 1999). Heterozygote mice (β_2 -AR^{+/-}) were bred in our animal facilities. The experiments were conducted on male β_2 -AR^{+/+} and β_2 -AR^{-/-} littermate mice from this breeding. These mice were genotyped upon weaning. All experiments started with 8- to 9-week-old mice. Mice were group-housed four to five per cage and kept under a 12-hour light/dark cycle (lights on at 6:00 AM) with food and water *ad libitum*. The animal facilities are registered for animal experimentation (Animal House Agreement C67-482-1). The scientists in charge of the experiments possess the French certificate authorizing experimentation on living animals, delivered by the governmental veterinary office. All procedures were performed in accordance with the guidelines for animal experimentation of the International Association for the Study of Pain and the European Communities Council Directive 86/6609/EEC.

Neuropathy and nociceptive testing

The neuropathy was induced by cuffing the main branch of the right sciatic nerve (Mosconi and Kruger, 1996; Benbouzid et al., 2008b). Surgeries were done under ketamine/xylazine anesthesia (ketamine: 17 mg/mL, xylazine: 2.5 mg/mL, intraperitoneal, 4 mL/kg) (Centravet, Taden, France). The common branch of the right sciatic nerve was exposed and a 2-mm section of split PE-20 polyethylene tubing (Harvard Apparatus, Les Ulis, France) was placed around it (Cuff group). The shaved skin was closed using suture. Sham-operated mice underwent the same surgical procedure described without implantation of the cuff (Sham group). The present work thus focused on mechanical allodynia. The mechanical allodynia was tested using von Frey hairs and results were expressed in grams. Mice were placed in clear Plexiglas boxes (7 cm × 9 cm × 7 cm) on an elevated mesh screen. Calibrated von Frey microfilaments (Bioseb, France; also available from Stoelting, USA) were applied to the plantar surface of each hindpaw in a series of ascending forces up to the mechanical

threshold. The filaments used in the studies were: 0.16, 0.4, 0.6, 1, 1.4, 2, 4, 6, and 8 grams. During the procedure, the filaments were tested five times per paw in ascending series until the paw withdrawal threshold was reached. This threshold was defined as the lower of two consecutive filaments for which we observed three or more withdrawals out of the five trials (Bohren et al., 2010). To study the antiallodynic effect of drugs treatment (nortriptyline, terbutaline, etanercept or pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)), we tested the mice in the morning before drug injections, as previously described (Benbouzid et al., 2008a; Bohren et al., 2010).

Treatment procedures

The TCA (nortriptyline), β_2 -mimetic (terbutaline), etanercept or PDTC treatments began sixteen days after the neuropathy was induced, and they were maintained at least twenty days. During the treatments, the mice received two injections per day (morning and evening) of nortriptyline (5 mg/kg) or terbutaline (0,5 mg/kg) (Sigma-Aldrich, France), or one injection per day (morning) of etanercept (5 mg/kg) (Enbrel®, Wyeth Pharmaceuticals, France), or PDTC (20 mg/kg) (Sigma-Aldrich, France). Drugs were dissolved in 0.9% NaCl solution that was also used for control injections. Nortriptyline, terbutaline, etanercept, PDTC and NaCl solutions were administered intraperitoneally in a volume of 5 mL/kg. For cellular and molecular experiments, the nervous tissues were collected five weeks post-surgery, *i.e.* after three weeks of treatment.

Noradrenergic lesions

Chemical noradrenergic lesion was done using the neurotoxin guanethidine monosulfate (Ismelin®, Genopharm laboratories) (Neil et al., 1991). Three different paradigms were used, each targeting different anatomic sites. (1) A group of mice underwent five daily intraperitoneal injections of guanethidine (30 mg/kg) in a volume of 5 mL/kg; (2) another received three daily intrathecal injections at lumbar level (30 μ g in 10 μ L); (3) a last group received three daily intrathecal injections at thoracic level (30 μ g in 10 μ L). All guanethidine administrations were done two weeks before nerve injury. A control group of non lesioned mice underwent the same nerve injury as the lesioned groups.

Immunostaining

Five weeks after cuff or sham surgery, mice were deeply anesthetized with pentobarbital and perfused intracardiacally. Lumbar dorsal root ganglia (L4, L5 and L6) and spinal cord were

dissected, postfixed, cryoprotected, embedded in OCT compound (Sakura Finetek, The Netherlands), frozen and cut into 14- μ m-thick sections that were then mounted on Superfrost®Plus slides (Kindler GmbH, Germany). To evaluate TH expression in nervous tissues or TNF- α expression in dorsal root ganglia, we used standardized procedures (Kaufling et al., 2010), incubating the sections with Sheep anti-mouse TH antibody (1:1000, Chemicon, AB1542) or Goat anti-mouse TNF- α antibody (1:100, R&D systems, AF-410-NA), respectively. The sections were then incubated with secondary Cy3-conjugated antibodies done in donkey (1:400, Jackson ImmunoResearch laboratories Inc.). Thereafter, the sections were washed, mounted with Vectashield, and viewed under a fluorescence microscope with appropriate filter.

Dorsal root ganglia cells culture

Dorsal root ganglia cells were prepared from adult mice. DRG from lumbar levels were dissected out, collected in phosphate-buffered solution (PBS), and enzymatically dissociated for 25 min at 37 °C with trypsin–EDTA (0.5 g/L, Seromed) and 2mg/mL of collagenase IA / dispase (Invitrogen). Enzymatic dissociation was stopped by the addition of the culture medium which consisted of MEM α (minimum essential medium alpha, Gibco, France) supplemented with 10% v/v heat-inactivated horse serum (Gibco) and 50 IU/mL penicillin-streptomycin (Gibco). The cells were then mechanically dissociated by trituration with fire-polished Pasteur pipettes of decreasing tip diameter. Dorsal root ganglia cells were plated on 15 mm glass coverslips previously coated with poly-D-lysine (0.02mg/mL). Cultures were maintained at 37 °C in a water-saturated atmosphere (95% air and 5% CO₂). Cell cultures were suitable for single cell PCR or calcium imaging experiments and were respectively used between 2-5 hours or between 12-15 hours after the seeding.

Single cell PCR

Single-cell PCR experiments were conducted on dissociated DRG culture of naïve mice. Cells were collected individually from the coverslip using a patch clamp pipette filled with 8 μ L of buffer solution (mM): 140 KCl, 1MgCl₂, 0.5 EGTA (pH 7.4). The glass pipette tip was then broken off into a thin-walled PCR reaction tube containing 40 μ L of the reaction mix SuperScriptIII One-Step RT-PCR system (Invitrogen) and the first set of primers. This first set included couples of primers for NF200 (accession number: NM010904), β_2 -AR (accession number: NM007420) and GS (accession number: AY044241). Two microlitres of SuperScriptIII RT/Platinum Taq mix were added to each sample and cDNAs were

synthesized by incubation at 50°C for 30 min and the first PCR consisted of an initial denaturation at 94°C for 2 min followed by 37 cycles (94°C for 30 s, 52°C for 45 s, 68°C for 45 s) and a final extension at 68°C for 5 min. The resulting product was diluted 1:100 and re-amplified by Taq PCR (Invitrogen) using a single couple of nested primers for each specific gene studied. The second amplification consisted of an initial denaturation step at 94°C for 2 min followed by 35 cycles (94°C for 30 s, 55°C for 45 s, 72°C for 45 s) and a final extension at 72°C for 5 min. One-fifth of the PCR product was run on an agarose gel and stained with ethidium bromide.

Calcium imaging

Calcium imaging experiments were conducted on dissociated dorsal root ganglia culture of sham and cuff mice. During calcium measurements, the cells were continuously superfused with a saline solution containing (in mM): NaCl, 130; KCl, 5; CaCl₂, 1; MgCl₂, 1; glucose, 10; HEPES, 10; at pH 7.4. The whole dish was renewed locally by a bath perfusion of saline solution, and the recorded field was renewed by a single-tip multichannel gravited-fed system (Ulmann et al., 2007), allowing a switch between various perfused solutions. Cells were loaded with Fura-2 by 60 min incubation at room temperature in the recording solution with 2 μ M Fura-2 acetoxymethyl ester (Fura-2/AM; Molecular Probes) and 0.001% (w/v) pluronic acid (Molecular Probes). Cells were washed three times with saline solution before and after loading. Fluorescence measurements on individual cells were performed on an inverted microscope (Axiovert 35; Zeiss) with an oil-immersion $\times 40$ objective (Fluor 40, NA 1.30; Nikon) using a quantitative real-time imaging system comprising a cooled CCD camera (CoolSnap HQ, Photometrics) and an image analysis software package (Imaging Workbench 4.0 Software, Axon Instrument). Fluorescence was alternately excited at wavelengths of 350 and 380 nm with a lambda-10 filter wheel (Sutter instrument), and emitted light was collected above 520 nm. Pairs of images were acquired every 2s. Intracellular calcium is expressed throughout as the fluorescence ratio F_{350}/F_{380} , calculated after background subtraction. Experiments were performed at room temperature. All drugs were prepared as 1000 $\times$ concentrated stock solutions. KCl (50 mM), ATP (50 μ M) and terbutaline (100 μ M) were diluted into saline solution immediately before use.

Real-time quantitative PCR

Quantification of gene expression in DRGs in each group was assessed with a real-time quantitative PCR method (n = 12 in each group). Total RNA was extracted using RNeasy

(QIAGEN), and cDNA was generated with *High capacity RNA-to-cDNA master mix* from Applied Biosystems. Quantitative RT-PCR was performed on a StepOne Real-Time PCR system (Applied Biosystems) using SYBR Green PCR Master Mix assay (Applied Biosystems). The amplification reaction was performed for 40 cycles with denaturation at 95°C for 10 minutes, followed by annealing at 95°C for 15 seconds, and extension and detection at 60°C for 1 minute. The relative RNA abundance of each target gene transcript was normalized against endogenous gene control acidic ribosomal phosphoprotein P0 (ARBP). Data were analyzed according to relative gene expression by $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, where C_t represents the threshold cycle for each transcript (Schmittgen and Zakrajsek, 2000). Primers are as follows: ARBP, 5'-GCCAGCTCAGAACACTGGTCTA-3' and 5'-ATGCCCCAAAGCCTGGAAGA-3'; TNF- α , 5'-CAGCCGATGGGTGTACCTT-3' and 5'-GGCAGCCTTGTCCCTTGA-3'; IL-10, 5'-GATGCCCCAGGCAGAGAA-3' and 5'-CACCCAGGGAATTCAAATGC-3'; TNFR1, 5'-TCCGCTTGCAAATGTCACA-3' and 5'-GGCAACAGCACCGCAGTAC-3'; ADBR2, 5'-TGGGAACGGCTACTCTAGCAA-3' and 5'-TGTTTGGCTCCCCTGTGTAGT-3'; Cox-2, 5'-TTCGGGAGCACAAACAGAGTGT-3' and 5'-GCTCATCACCCCACTCAGGAT-3'; IL-1 α , 5'-GGAGAGCCGGGTGACAGTATC-3' and 5'-TCAGCCGTCTCTTCTTCAGAATC-3'; IL-1 β , 5'-AGTTGACGGACCCCCAAAAGA-3' and 5'-GGACAGCCCAGGTCAAAGG-3'; IL-6, 5'-CCACGGCCTTCCCTACTTC-3' and 5'-TTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA-3'; NF κ B, 5'-TGGCCGTGGAGTACGACAA-3' and 5'-GCATCACCCCTCCAGAAGCA-3'; I κ B β , 5'-CCATACCCCACTCCATGTAGCT-3' and 5'-TGAGCAGCCGGACCATCT-3'; I κ B α , 5'-TCCTGCACTTGGCAATCATC-3' and 5'-CCTGACCAATGACTTCCATGGT-3'.

Immunoblotting analysis

Total protein was extracted in 150 μ L lysis buffer (20 mM Tris pH 7.5 ;150 mM NaCl ; 10% glycerol ; 1% NP40 ; Protease Inhibitors Cocktail, Roche). The proteins were quantitated with DC protein assay kit (Bio-Rad), and 15 μ g of total protein were resolved by 12 % SDS-polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions and then transferred to PVDF membrane. The blots were incubated for 1 hour in blocking agent (ECL kit, Amersham Biosciences) and subsequently, overnight with the specific antibodies for TNF- α (1:1000, R&D systems, AF-410-NA) and β -tubulin (1:5000, Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-9935) followed by anti-goat HRP-conjugated secondary antibodies (1:5000, Chemicon, AP307P and AP106P). Blots were evaluated by chemoluminescence (ECL *Advance Western Blotting Detection System Kit*, Amersham Biosciences, RPN 2135) using Hyperfilm substrates

(Amersham Biosciences, RPN 1674K). Relative protein expression was determined using the densitometry tool of Adobe Photoshop CS3 software.

Statistics

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

Acknowledgements

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

References

- Attal N, Cruccu G, Haanpaa M, Hansson P, Jensen TS, Nurmikko T, Sampaio C, Sindrup S, Wiffen P (2006) EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain. *Eur J Neurol* 13:1153-1169.
- Austin PJ, Moalem-Taylor G (2011) The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *J Neuroimmunol* 229:26-50.
- Benbouzid M, Choucair-Jaafar N, Yalcin I, Waltisperger E, Muller A, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2008a) Chronic, but not acute, tricyclic antidepressant treatment alleviates neuropathic allodynia after sciatic nerve cuffing in mice. *Eur J Pain* 12:1008-1017.
- Benbouzid M, Pallage V, Rajalu M, Waltisperger E, Doridot S, Poisbeau P, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2008b) Sciatic nerve cuffing in mice: a model of sustained neuropathic pain. *Eur J Pain* 12:591-599.
- Bohren Y, Karavelic D, Tessier LH, Yalcin I, Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2010) Mu-opioid receptors are not necessary for nortriptyline treatment of neuropathic allodynia. *Eur J Pain* 14:700-704.
- Choucair-Jaafar N, Yalcin I, Rodeau JL, Waltisperger E, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2009) Beta2-adrenoceptor agonists alleviate neuropathic allodynia in mice after chronic treatment. *Br J Pharmacol* 158:1683-1694.
- Chruscinski AJ, Rohrer DK, Schauble E, Desai KH, Bernstein D, Kobilka BK (1999) Targeted disruption of the beta2 adrenergic receptor gene. *J Biol Chem* 274:16694-16700.
- Cok OY, Eker HE, Yalcin I, Barrot M, Aribogan A (2010) Is there a place for beta-mimetics in clinical management of neuropathic pain? Salbutamol therapy in six cases. *Anesthesiology* 112:1276-1279.
- Dworkin RH, O'Connor AB, Backonja M, Farrar JT, Finnerup NB, Jensen TS, Kalso EA, Loeser JD, Miaskowski C, Nurmikko TJ, Portenoy RK, Rice AS, Stacey BR, Treede RD, Turk DC, Wallace MS (2007) Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain* 132:237-251.
- El Mansari M, Guiard BP, Chernoloz O, Ghanbari R, Katz N, Blier P (2010) Relevance of norepinephrine-dopamine interactions in the treatment of major depressive disorder. *CNS Neurosci Ther* 16:e1-17.
- Elenkov IJ, Hasko G, Kovacs KJ, Vizi ES (1995) Modulation of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production by selective alpha- and beta-adrenergic drugs in mice. *J Neuroimmunol* 61:123-131.
- Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES (2000) The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 52:595-638.
- Empl M, Renaud S, Erne B, Fuhr P, Straube A, Schaeren-Wiemers N, Steck AJ (2001) TNF-alpha expression in painful and nonpainful neuropathies. *Neurology* 56:1371-1377.
- Fedyk ER, Adawi A, Looney RJ, Phipps RP (1996) Regulation of IgE and cytokine production by cAMP: implications for extrinsic asthma. *Clin Immunol Immunopathol* 81:101-113.
- Finnerup NB, Sindrup SH, Jensen TS (2010) Recent advances in pharmacological treatment of neuropathic pain. *F1000 Med Rep* 2:52.
- Fu ES, Zhang YP, Sagen J, Candiotti KA, Morton PD, Liebl DJ, Bethea JR, Brambilla R (2010) Transgenic inhibition of glial NF-kappa B reduces pain behavior and inflammation after peripheral nerve injury. *Pain* 148:509-518.

- Hanani M (2005) Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res Brain Res Rev* 48:457-476.
- Hao S, Mata M, Glorioso JC, Fink DJ (2007) Gene transfer to interfere with TNF α signaling in neuropathic pain. *Gene Ther* 14:1010-1016.
- Hasko G, Elenkov IJ, Kvetan V, Vizi ES (1995) Differential effect of selective block of α 2-adrenoreceptors on plasma levels of tumour necrosis factor- α , interleukin-6 and corticosterone induced by bacterial lipopolysaccharide in mice. *J Endocrinol* 144:457-462.
- Hehlgans T, Pfeffer K (2005) The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115:1-20.
- Hetier E, Ayala J, Bousseau A, Prochiantz A (1991) Modulation of interleukin-1 and tumor necrosis factor expression by beta-adrenergic agonists in mouse ameboid microglial cells. *Exp Brain Res* 86:407-413.
- Ho C, O'Leary ME (2010) Single-cell analysis of sodium channel expression in dorsal root ganglion neurons. *Mol Cell Neurosci* 46:159-166.
- Kaltschmidt B, Kaltschmidt C (2009) NF- κ B in the nervous system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a001271.
- Kaufling J, Waltisperger E, Bourdy R, Valera A, Veinante P, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2010) Pharmacological recruitment of the GABAergic tail of the ventral tegmental area by acute drug exposure. *Br J Pharmacol* 161:1677-1691.
- Korhonen T, Karppinen J, Paimela L, Malmivaara A, Lindgren KA, Jarvinen S, Niinimäki J, Veeger N, Seitsalo S, Hurri H (2005) The treatment of disc herniation-induced sciatica with infliximab: results of a randomized, controlled, 3-month follow-up study. *Spine (Phila Pa 1976)* 30:2724-2728.
- Krell HV, Leuchter AF, Cook IA, Abrams M (2005) Evaluation of reboxetine, a noradrenergic antidepressant, for the treatment of fibromyalgia and chronic low back pain. *Psychosomatics* 46:379-384.
- Leung L, Cahill CM (2010) TNF- α and neuropathic pain--a review. *J Neuroinflammation* 7:27.
- Lindenlaub T, Sommer C (2003) Cytokines in sural nerve biopsies from inflammatory and non-inflammatory neuropathies. *Acta Neuropathol* 105:593-602.
- Loeser JD, Treede RD (2008) The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain* 137:473-477.
- Makarov SS (2000) NF- κ B as a therapeutic target in chronic inflammation: recent advances. *Mol Med Today* 6:441-448.
- Mantyh PW, Rogers SD, Allen CJ, Catton MD, Ghilardi JR, Levin LA, Maggio JE, Vigna SR (1995) Beta 2-adrenergic receptors are expressed by glia in vivo in the normal and injured central nervous system in the rat, rabbit, and human. *J Neurosci* 15:152-164.
- Maruo K, Yamamoto H, Yamamoto S, Nagata T, Fujikawa H, Kanno T, Yaguchi T, Maruo S, Yoshiya S, Nishizaki T (2006) Modulation of P2X receptors via adrenergic pathways in rat dorsal root ganglion neurons after sciatic nerve injury. *Pain* 120:106-112.
- McLachlan EM, Janig W, Devor M, Michaelis M (1993) Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia. *Nature* 363:543-546.
- Mico JA, Ardid D, Berrocoso E, Eschalier A (2006) Antidepressants and pain. *Trends Pharmacol Sci* 27:348-354.
- Mosconi T, Kruger L (1996) Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy: ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations. *Pain* 64:37-57.

- Moulin DE et al. (2007) Pharmacological management of chronic neuropathic pain - consensus statement and guidelines from the Canadian Pain Society. *Pain Res Manag* 12:13-21.
- Nakamura A, Johns EJ, Imaizumi A, Abe T, Kohsaka T (1998) Regulation of tumour necrosis factor and interleukin-6 gene transcription by beta2-adrenoceptor in the rat astrocytes. *J Neuroimmunol* 88:144-153.
- Neil A, Attal N, Guilbaud G (1991) Effects of guanethidine on sensitization to natural stimuli and self-mutilating behaviour in rats with a peripheral neuropathy. *Brain Res* 565:237-246.
- Peng XM, Zhou ZG, Glorioso JC, Fink DJ, Mata M (2006) Tumor necrosis factor-alpha contributes to below-level neuropathic pain after spinal cord injury. *Ann Neurol* 59:843-851.
- Ramer MS, Bisby MA (1998) Normal and injury-induced sympathetic innervation of rat dorsal root ganglia increases with age. *J Comp Neurol* 394:38-47.
- Saarto T, Wiffen PJ (2007) Antidepressants for neuropathic pain. *Cochrane Database Syst Rev*:CD005454.
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA (2000) Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* 46:69-81.
- Scholz J, Woolf CJ (2007) The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci* 10:1361-1368.
- Severn A, Rapson NT, Hunter CA, Liew FY (1992) Regulation of tumor necrosis factor production by adrenaline and beta-adrenergic agonists. *J Immunol* 148:3441-3445.
- Sommer C, Schafers M, Marziniak M, Toyka KV (2001a) Etanercept reduces hyperalgesia in experimental painful neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 6:67-72.
- Sommer C, Lindenlaub T, Teuteberg P, Schafers M, Hartung T, Toyka KV (2001b) Anti-TNF-neutralizing antibodies reduce pain-related behavior in two different mouse models of painful mononeuropathy. *Brain Res* 913:86-89.
- Stone EA, John SM (1990) In vivo measurement of extracellular cyclic AMP in the brain: use in studies of beta-adrenoceptor function in nonanesthetized rats. *J Neurochem* 55:1942-1949.
- Sun T, Song WG, Fu ZJ, Liu ZH, Liu YM, Yao SL (2006) Alleviation of neuropathic pain by intrathecal injection of antisense oligonucleotides to p65 subunit of NF-kappaB. *Br J Anaesth* 97:553-558.
- Suzuki T, Ueta K, Tamagaki S, Mashimo T (2008) Antiallodynic and antihyperalgesic effect of milnacipran in mice with spinal nerve ligation. *Anesth Analg* 106:1309-1315, table of contents.
- Szelenyi J, Kiss JP, Vizi ES (2000) Differential involvement of sympathetic nervous system and immune system in the modulation of TNF-alpha production by alpha2- and beta-adrenoceptors in mice. *J Neuroimmunol* 103:34-40.
- Thacker MA, Clark AK, Marchand F, McMahon SB (2007) Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules. *Anesth Analg* 105:838-847.
- Tobinick E, Davoodifar S (2004) Efficacy of etanercept delivered by perispinal administration for chronic back and/or neck disc-related pain: a study of clinical observations in 143 patients. *Curr Med Res Opin* 20:1075-1085.
- Trimmer PA, Evans T, Smith MM, Harden TK, McCarthy KD (1984) Combination of immunocytochemistry and radioligand receptor assay to identify beta-adrenergic receptor subtypes on astroglia in vitro. *J Neurosci* 4:1598-1606.

- Ulmann L, Rodeau JL, Danoux L, Contet-Audonneau JL, Pauly G, Schlichter R (2007) Trophic effects of keratinocytes on the axonal development of sensory neurons in a coculture model. *Eur J Neurosci* 26:113-125.
- Vallejo R, Tilley DM, Vogel L, Benyamin R (2010) The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. *Pain Pract* 10:167-184.
- van der Poll T, Jansen J, Endert E, Sauerwein HP, van Deventer SJ (1994) Noradrenaline inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and interleukin 6 production in human whole blood. *Infect Immun* 62:2046-2050.
- Wagner R, Myers RR (1996) Endoneurial injection of TNF-alpha produces neuropathic pain behaviors. *Neuroreport* 7:2897-2901.
- White FA, Feldman P, Miller RJ (2009) Chemokine signaling and the management of neuropathic pain. *Mol Interv* 9:188-195.
- Yalcin I, Tessier LH, Petit-Demouliere N, Doridot S, Hein L, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2009a) Beta2-adrenoceptors are essential for desipramine, venlafaxine or reboxetine action in neuropathic pain. *Neurobiol Dis* 33:386-394.
- Yalcin I, Tessier LH, Petit-Demouliere N, Waltisperger E, Hein L, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2010) Chronic treatment with agonists of beta(2)-adrenergic receptors in neuropathic pain. *Exp Neurol* 221:115-121.
- Yalcin I, Choucair-Jaafar N, Benbouzid M, Tessier LH, Muller A, Hein L, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2009b) beta(2)-adrenoceptors are critical for antidepressant treatment of neuropathic pain. *Ann Neurol* 65:218-225.
- Yoshimura M, Furue H (2006) Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. *J Pharmacol Sci* 101:107-117.
- Zhou Z, Peng X, Hagshenas J, Insolera R, Fink DJ, Mata M (2010) A novel cell-cell signaling by microglial transmembrane TNFalpha with implications for neuropathic pain. *Pain* 151:296-306.
- Zochodne DW, Low PA, Dyck PJ (1989) Adrenergic sympathectomy ablates unmyelinated fibers in the rat 'preganglionic' cervical sympathetic trunk. *Brain Res* 498:221-228.

B. Rôle du système opioïdergique dans l'effet thérapeutique des antidépresseurs tricycliques et des β_2 -mimétiques

Les données cliniques et précliniques montrent qu'un traitement prolongé est nécessaire à l'obtention de l'effet thérapeutique des antidépresseurs (Benbouzid et al., 2008a; Yalcin et al., 2009a). Les travaux antérieurs du laboratoire ont montré qu'il en est de même avec un β_2 -mimétique (Choucair-Jaafar et al., 2009; Yalcin et al., 2010). Ce délai d'action indique que les antidépresseurs et les β_2 -mimétiques agissent par un mécanisme indirect pour soulager la douleur neuropathique. Dans le chapitre précédent, nous avons étudié certains des acteurs de ce mécanisme. Les données antérieures indiquent qu'un autre acteur jouerait un rôle important : le système opioïdergique endogène.

I. Rôle des récepteurs opioïdes *Mu* dans l'effet thérapeutique d'un antidépresseur tricyclique

Les études antérieures ont déjà largement mis en évidence le recrutement du système opioïdergique endogène, notamment des DOR, dans les propriétés antiallodymiques des antidépresseurs (Benbouzid et al., 2008a; Benbouzid et al., 2008c). Cependant qu'en est-il des autres récepteurs opioïdes ? Il a été démontré que l'administration aiguë de naloxone à faible dose n'influçait pas l'action thérapeutique des antidépresseurs (Benbouzid et al., 2008a), ce qui laisserait penser que les MOR ne jouent pas un rôle prépondérant dans l'effet antiallodymique d'un traitement prolongé par les antidépresseurs. Mais, le fait d'injecter de plus fortes doses de naloxone, donc moins sélectives, montre seulement une implication du système opioïdergique sans pouvoir présumer de l'implication ou non des MOR. Dans le but de déterminer le(s) protagoniste(s) opioïde(s) impliqué(s) dans l'action antiallodymique d'un traitement au long cours de la douleur neuropathique par un antidépresseur, nous avons utilisé une approche génétique. En effet, l'utilisation de souris déficientes pour les MOR nous a permis d'évaluer si ces récepteurs étaient nécessaires à l'action thérapeutique d'un traitement prolongé par un antidépresseur. Nos résultats, présentés sous la forme d'une publication, montrent que les MOR ne sont pas indispensables à l'action antiallodymique d'un antidépresseur, alors qu'ils le sont pour l'action analgésique de la morphine. De plus, ces résultats mettent l'accent sur l'importance déterminante des DOR.



Mu-opioid receptors are not necessary for nortriptyline treatment of neuropathic allodynia

Yohann Bohren^{a,1}, Dzenan Karavelic^{a,1}, Luc-Henri Tessier^a, Ipek Yalcin^a, Claire Gavériaux-Ruff^{b,c}, Brigitte L. Kieffer^c, Marie-José Freund-Mercier^{a,b}, Michel Barrot^{a,*}

^a Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique, Strasbourg, France

^b Université de Strasbourg, Strasbourg, France

^c Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 July 2009

Received in revised form 20 November 2009

Accepted 20 November 2009

Available online 28 December 2009

Keywords:

Neuropathic pain

Antidepressant

Mechanical allodynia

Opioid receptors

Mice

ABSTRACT

Tricyclic antidepressants (TCAs) are among the first line treatments clinically recommended against neuropathic pain. However, the mechanism by which they alleviate pain is still unclear. Pharmacological and genetic approaches evidenced a critical role of delta-opioid receptors (DORs) in the therapeutic action of chronic TCA treatment. It is however unclear whether mu-opioid receptors (MORs) are also necessary to the pain-relieving action of TCAs. The lack of highly selective MOR antagonists makes difficult to conclude based on pharmacological studies. In the present work, we thus used a genetic approach and compared mutant mice lacking MORs and their wild-type littermates. The neuropathy was induced by unilateral sciatic nerve cuffing. The threshold for mechanical response was evaluated using von Frey filaments. MOR-deficient mice displayed the same baseline for mechanical sensitivity as their wild-type littermates. After sciatic nerve cuffing, both wild-type and MOR-deficient mice displayed an ipsilateral mechanical allodynia. After about 10 days of treatment, nortriptyline suppressed this allodynia in both wild-type and MOR-deficient mice. MORs are thus not critical for nortriptyline action against neuropathic pain. An acute injection of the DOR antagonist naltrindole induced a relapse of neuropathic allodynia in both wild-type and MOR-deficient mice, thus confirming the critical role of DORs in nortriptyline action. Moreover, morphine induced an acute analgesia in control and in neuropathic wild-type mice, but was without effect in MOR-deficient mice. While MORs are crucial for morphine action, they are not critical for nortriptyline action. Our results highlight the functional difference between DORs and MORs in mechanisms of pain relief.

© 2009 European Federation of International Association for the Study of Pain Chapters. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Neuropathic pain is a pain arising as a direct consequence of a lesion or disease affecting the somatosensory system (Loeser and Treede, 2008). It is generally a chronic condition, resistant to classical analgesics (Attal et al., 2006). As first line of treatment, the current pharmacotherapy includes the use of inhibitors of the noradrenaline and serotonin reuptake sites, such as tricyclic antidepressant drugs (TCAs) (Attal et al., 2006; Dworkin et al., 2007; Moulin et al., 2007). The clinical efficacy of TCAs against this neurological disorder is well-documented (Moulin et al., 2007). These drugs are not acute analgesics but require a sustained treat-

ment to relieve neuropathic pain, which suggests the recruitment of a secondary downstream mechanism and neuronal plasticity. This mechanism still remains to be detailed, but an implication of the endogenous opioid system has been proposed (Valverde et al., 1994; Gray et al., 1998; Marchand et al., 2003c; Mico et al., 2006; Benbouzid et al., 2008a,b).

Some studies on the acute or sub-chronic action of antidepressant drugs showed that opioid antagonists can block the antidepressant-induced analgesia (Reichenberg et al., 1985; Valverde et al., 1994; Gray et al., 1998; Su and Gebhart, 1998; Schreiber et al., 1999, 2002; Marchand et al., 2003c; Ortega-Alvaro et al., 2004; Mico et al., 2006; Benbouzid et al., 2008a,b), suggesting the involvement of the opioid system. On the contrary, other studies showed no effect of opioid antagonists on antidepressant drug action (Pick et al., 1992; Fuchs et al., 1996; Ghelardini et al., 2000; Marchand et al., 2003a,b). However, most of these studies did not address the consequences of a long-term TCA treatment, as used in human patients, or did not specifically concern neuropathic pain

* Corresponding author. Address: Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Département Nociception et Douleur, 21 rue Descartes, 67084 Strasbourg, France. Tel.: +33 3 68 85 14 50; fax: +33 3 88 61 33 47.

E-mail address: mbarrot@unistra.fr (M. Barrot).

¹ Both authors equally participated to this work.

condition. Moreover, the lack of selectivity of some antagonists, such as naloxone, limited the possibility to identify precisely the implicated receptors. Using a murine model of neuropathic pain that is sensitive to long-term but not to acute antidepressant treatment (Benbouzid et al., 2008a,b,c; Yalcin et al., 2009a,b), we recently showed that long-term nortriptyline alleviates neuropathic allodynia by the downstream recruitment of the opioid system and more particularly by the recruitment of delta-opioid receptors (DORs) (Benbouzid et al., 2008a,b).

In the present study, we used a genetic approach to evaluate whether mu-opioid receptors (MORs) are also critical for the anti-allodynic action of long-term nortriptyline treatment. Our results demonstrate that while MORs are crucial for morphine analgesic action, they are not necessary for nortriptyline to alleviate neuropathic allodynia, which highlights the specific role played by DORs.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The generation of mice lacking the MORs was previously described (Matthes et al., 1996), and these mice were backcrossed in a C57BL/6J background for at least 10 generations. Heterozygotes mice ($MOR^{+/-}$) were bred in our animal facilities and the experiments were conducted on male $MOR^{+/+}$ and $MOR^{-/-}$ littermate mice from this breeding. They were genotyped upon weaning and adult male mice weighing 25–30 g were used in the experiments. The mice were group-housed three to four per cage and maintained under a 12-h light/dark cycle (lights on at 6:00 AM) with food and water *ad libitum*. The animal facilities are legally registered for animal experimentation under Animal House Agreement B67-482-1. The scientists in charge of the experiments possess the French certificate authorizing experimentation on living animals, delivered by the governmental veterinary office. All procedures were performed in accordance with the guidelines for animal experimentation of the International Association for the Study of pain (IASP) and the European Communities Council Directive 86/609/EEC.

2.2. Surgery

The neuropathy was induced by cuffing the main branch of the right sciatic nerve (Mosconi and Kruger, 1996; Pitcher et al., 1999; Benbouzid et al., 2008c). Surgeries were done under ketamine/xylazine anesthesia (ketamine: 17 mg/mL, xylazine: 2.5 mg/mL, intraperitoneal [IP], 4 mL/kg) (Centravet, Taden, France). The common branch of the right sciatic nerve was exposed and a 2-mm section of split PE-20 polyethylene tubing (Harvard Apparatus, Les Ulis, France) was placed around it (Cuff group) (Benbouzid et al., 2008a,b,c; Yalcin et al., 2009a,b). The shaved skin was closed using suture. Sham-operated mice underwent the same surgical procedure described above without implantation of the Cuff (Sham group).

2.3. Drugs

The nortriptyline treatment began 15 days after the neuropathy was induced, and the treatment lasted at least 20 days (Benbouzid et al., 2008a,b,c; Yalcin et al., 2009a,b). During the treatment, the mice received two injections per day (morning and evening) of nortriptyline (5 mg/kg) (Sigma–Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). The drug was dissolved in 0.9% NaCl solution that was also used for control injections. Both nortriptyline and NaCl solution were administered IP in a volume of 5 mL/kg. The injection of naltrindole hydrochloride (5 mg/kg; subcutaneously [SC]) (Sigma–Al-

drich, St. Quentin Fallavier, France) was done 35 days after surgery, i.e., after 21 days of antidepressant treatment. On saline-treated animals, morphine (10 mg/kg, SC; Sigma–Aldrich, France) was acutely injected on day 40 post-surgery.

2.4. Nociceptive test

After sciatic nerve cuffing, mice display a heat thermal hyperalgesia lasting only 3 weeks while the mechanical allodynia remains stable over 2 months (Benbouzid et al., 2008a,b,c; Yalcin et al., 2009a,b). The present work thus focused on mechanical allodynia. The mechanical allodynia was determined using von Frey hairs and results were expressed in grams. Mice were placed in clear Plexiglas boxes (7 cm × 9 cm × 7 cm) on an elevated mesh screen. Calibrated von Frey microfilaments (Bioseb, France; also available from Stoelting, USA) were applied to the plantar surface of each hindpaw in a series of ascending forces up to the mechanical threshold. The filaments used in the studies were: 0.16, 0.4, 0.6, 1, 1.4, 2, 4, 6, 8, 10 and 15 grams. The highest ones were only necessary for mice under deep morphine analgesia, and morphine analgesia testing stopped at 15 g even if no response was observed. During the procedure, the filaments were tested five times per paw in ascending series until the paw withdrawal threshold was reached. This threshold was defined as the lowest of two consecutive filaments for which we observed three or more withdrawals out of the five trials (Benbouzid et al., 2008a,b,c; Yalcin et al., 2009a,b). To study the antiallodynic effect of nortriptyline treatment, we tested the mice in the morning before nortriptyline drug injection, as previously described (Benbouzid et al., 2008a,b,c; Yalcin et al., 2009a,b). The effect of acute drug injections (saline, naltrindole or morphine) was evaluated before (pre-test) and 30 min after (post-test) the considered drug injection.

2.5. Analyses

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

3. Results

3.1. Mechanical sensitivity

MOR-deficient mice displayed the same baseline for mechanical sensitivity as their wild-type littermates (Fig. 1A and B). The Sham surgery did not affect the paw withdrawal thresholds, while the Cuff-implanted mice displayed an ipsilateral mechanical allodynia which was present both in wild-type mice and in MOR-deficient mice (Surgery × Time interaction, $MOR^{+/+}$ $F_{6,180} = 20.2$, $p < 0.0001$, $MOR^{-/-}$ $F_{6,138} = 7.86$, $p < 0.0001$; post hoc: Cuff < Sham at $p < 0.0001$ on days 2 to 15) (Fig. 1B). No difference was observed in allodynia intensity depending on the presence or absence of the MORs (Genotype effect, $F_{6,180} = 0.9$, $p > 0.48$).

3.2. Nortriptyline effect

Two weeks after the Cuff insertion, we started the treatments with either nortriptyline (5 mg/kg) or the control saline solution (0.9% NaCl). The mice received two injections per day and were tested in the morning before drug injection, as previously

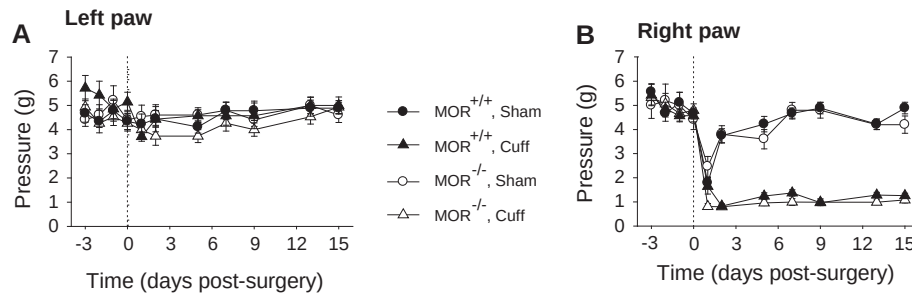


Fig. 1. Consequence of Cuff implantation in wild-type and in MOR-deficient mice. Adult male mice underwent surgery for unilateral Cuff implantation around the main branch of the right sciatic nerve. Sham animals underwent the same surgical procedure without Cuff implantation. The mechanical allodynia was tested using the von Frey hairs. (A) The Cuff implantation did not affect the mechanical threshold of paw contralateral to Cuff implantation (left paw). (B) However it induced an ipsilateral (right paw) allodynia in both wild-type ($n = 14$) and MOR-deficient ($n = 15$) mice. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

described (Benbouzid et al., 2008a,b; Yalcin et al., 2009a). We previously reported that such treatment has no acute analgesic effect whereas it suppressed the neuropathic allodynia after 10 to 12 days of treatment (Benbouzid et al., 2008a,b; Yalcin et al., 2009a). Similarly, the nortriptyline treatment alleviated the Cuff-induced allodynia in wild-type mice after about 10 days of treatment (Surgery $\times$ Treatment $\times$ Time interaction, $F_{9,252} = 6.14$, $p < 0.0001$; post hoc: (CuffNor = Sham) $>$ CuffSal at $p < 0.01$ on days 24 to 35) (Fig. 2A). The same antiallodynic effect was also present in MOR-deficient mice ($F_{9,189} = 4.71$, $p < 0.0001$; post hoc: (CuffNor = Sham) $>$ CuffSal at $p < 0.05$ on days 24 to 35) (Fig. 2B). In both cases, nortriptyline suppressed the Cuff-induced allodynia without affecting the mice with Sham surgery.

3.3. Naltrindole effect

We tested the consequences of an acute injection with the DOR antagonist naltrindole (5 mg/kg) in the MOR-deficient and wild-type mice. After 3 weeks of treatment with nortriptyline or saline, the acute injection of naltrindole totally suppressed the benefit of nortriptyline treatment (MOR^{+/+}: $F_{1,28} = 60.45$, $p < 0.05$; MOR^{-/-}: $F_{1,21} = 19.47$, $p < 0.05$) (Fig. 3A and B). Within 30 min following the DOR antagonist injection, we observed a relapse of allodynia. This effect was present both in MOR-deficient mice and in wild-type mice. We also controlled that naltrindole per se had no effect in mice with Sham surgery, or in neuropathic mice treated with saline.

3.4. Morphine effect

The acute injection of morphine (10 mg/kg) induced an acute analgesia both in Sham-operated and in Cuff-implanted wild-type

mice. (Left paw: $F_{1,22} = 142.5$, $p < 0.0001$; right paw: $F_{1,22} = 319.1$, $p < 0.0001$.) (Data not shown.) The same dose of morphine had however no effect in MOR-deficient mice, whether or not neuropathic (Data not shown).

4. Discussion

In the present work, we studied the impact of MORs on a chronic nortriptyline treatment in a murine model of neuropathic pain. We demonstrated that MORs are not necessary for the anti-allodynic action of nortriptyline while they are critical for the analgesic action of morphine. Moreover, we showed that a DOR antagonist suppressed the antiallodynic action of nortriptyline in a MOR-independent way.

The similar baseline for mechanical sensitivity between MOR-deficient mice and their wild-type littermates is in agreement with previous reports concerning nociceptive response in these mice (Matthes et al., 1996; Fuchs et al., 1999; Kieffer and Gaveriaux-Ruff, 2002). MORs are thus not critical to set-up the thresholds for mechanical sensitivity in unchallenged situations. After induction of the neuropathy, the intensity of allodynia was also similar between MOR-deficient mice and their wild-type littermates. These results suggested that MORs do not play a critical role in the physiological control of neuropathic allodynia in our model. Conversely, a bilateral increase in MOR-deficient mice mechanical allodynia as compared to wild-type mice has been observed in a more drastic model of neuropathy, a variant of the spared nerve injury with L5 spinal nerve ligation and section (Mansikka et al., 2004). Our results are however in agreement with pharmacological data showing that systemic administration of naloxone, a broad-spectrum opioid receptor antagonist, did not influence mechanical

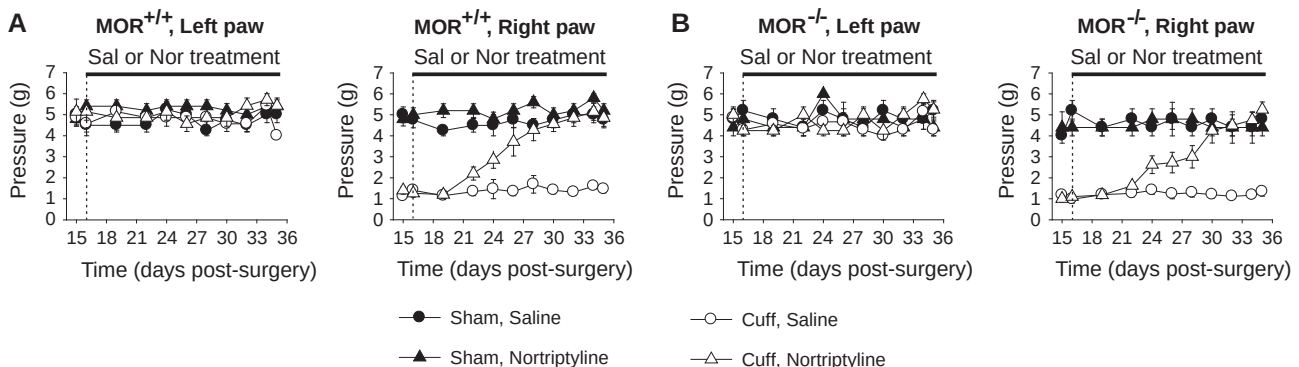


Fig. 2. Nortriptyline treatment of neuropathic allodynia. Two weeks after Cuff implantation, the daily treatment with nortriptyline (5 mg/kg, i.p. twice a day) or its saline control (0.9% NaCl) started and was maintained for 3 weeks. The hindpaw mechanical threshold was tested before the morning drug injection, using von Frey filaments. (A) In wild-type mice the treatments did not affect the mechanical threshold of the contralateral paw, but chronic nortriptyline suppressed the ipsilateral Cuff-induced allodynia. (B) Similar results were observed in MOR-deficient mice. Data are expressed in mean $\pm$ SEM. ($n = 5-10$ for the different Sham groups, $n = 7-8$ for the different Cuff groups).

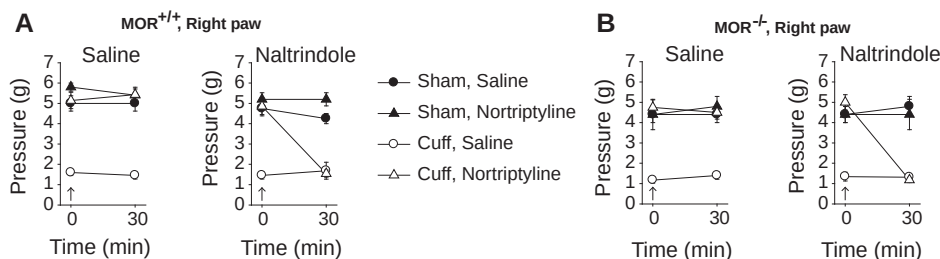


Fig. 3. Effect of the DOR antagonist naltrindole. After 3 weeks of treatment with either nortriptyline or saline, the mice received an acute injection of saline (s.c.) and of the DOR antagonist naltrindole (5 mg/kg, s.c.). The nociceptive mechanical threshold was tested before (0 min) and 30 min after these acute injections. (A) While acute saline injection did not affect the paw withdrawal threshold, the naltrindole injection induced a relapse of the allodynia in neuropathic wild-type mice treated by nortriptyline. No effect of naltrindole was observed in Sham mice or in saline-treated neuropathic mice. (B) Similar results were obtained in MOR-deficient mice. Data are expressed in mean $\pm$ SEM. ($n = 5$ –10 for the different Sham groups, $n = 7$ –8 for the different Cuff groups).

allodynia (von Frey test) or thermal hyperalgesia (tail flick test) in other models of neuropathic pain such as the L5/L6 ligature or ischemic spinal cord injury (Hao et al., 1998; Wei et al., 1998; McGaraughty et al., 2005).

After chronic treatment with the TCA nortriptyline, the mice recovered from their neuropathic allodynia. As expected we observed this recovery in wild-type mice, but it was also present in MOR-deficient mice and the delay for therapeutic onset was unaffected by the presence or absence of MORs. These results show that MORs are not necessary for nortriptyline to exert its antiallodynic action. This contrasts with previous data on DORs. Indeed, the DOR antagonist naltrindole has been shown to acutely block the antiallodynic effect of chronic nortriptyline treatment (Benbouzid et al., 2008a,b) and this TCA is totally ineffective in DOR-deficient mice (Benbouzid et al., 2008a,b). Thus, present data suggest a striking difference between DOR and MOR implication in nortriptyline action against neuropathic pain. To strengthen this finding, we tested the effect of DOR antagonist naltrindole in the MOR-deficient and wild-type mice and showed that it blocked in both cases the antiallodynic action of nortriptyline. It confirmed that chronic nortriptyline treatment alleviates neuropathic allodynia by recruiting an opioid tone acting on DORs. While DOR implication in this neuropathic pain treatment is critical, the implication of DORs in chronic pain processing is more subtle. In the sciatic nerve cuffing model, we previously observed no alteration of neuropathic allodynia after naltrindole administration or in DOR-deficient mice (Benbouzid et al., 2008a,b). A mild increase in mechanical allodynia and heat hyperalgesia and a more pronounced increase in cold allodynia were however observed after tight ligation of the sciatic nerve in DOR-deficient mice (Nadal et al., 2006). A delayed recovery from mechanical allodynia and heat hyperalgesia is also present in DOR-deficient mice with inflammation due to intraplantar complete Freund's adjuvant administration (Gaveriaux-Ruff et al., 2008). These results suggest a mild physiological modulation of pain response by endogenous DOR activity, but a stronger involvement of these receptors in the pharmacological control of pain. Interestingly, recent studies revealed that a DOR agonist can display an antihyperalgesic and antiallodynic effectiveness in a neuropathic pain model, which suggests that DORs could be potential therapeutic targets for neuropathic pain management (Holdridge and Cahill, 2007; Kabli and Cahill, 2007).

Even if MORs are not critical for the action of nortriptyline against neuropathic pain, they have been implicated in the action of opiates against pain. In MOR-deficient mice, morphine analgesia was thus abolished (Matthes et al., 1996; Sora et al., 1997, 1999; Fuchs et al., 1999; Schuller et al., 1999; Qiu et al., 2000) or strongly reduced (Loh et al., 1998) in models of thermal (Matthes et al., 1996; Sora et al., 1997; Loh et al., 1998; Schuller et al., 1999), mechanical (Fuchs et al., 1999), chemical (Sora et al., 1999), and inflammatory (Qiu et al., 2000) pain. In our model of neuropathic

pain, the acute injection of morphine induced an acute analgesia both in Sham-operated and in Cuff-implanted wild-type mice, but it had no effect in MOR-deficient mice. These findings confirmed in a pathological condition, such as neuropathic pain, that morphine analgesia is mediated through MORs.

Our study highlights a clear-cut functional difference between DORs and MORs in mechanisms of pain relief by nortriptyline. In other situations, a differential influence of these receptors in the processing of nociceptive information can also be experimentally observed. Indeed, the expression of both receptors is segregated in the dorsal root ganglia, and their manipulation by intrathecal delivery of agonists revealed that local DORs and MORs preferentially influence mechanical and heat processing respectively (Scherrer et al., 2009). This dichotomy in mechanical and heat nociceptive controls by opioid receptors is however not present when considering the whole organism or a pathological situation. DOR agonists can for example relieve both heat hyperalgesia and mechanical allodynia in an inflammatory situation (Gaveriaux-Ruff et al., 2008; Pradhan et al., 2009), and DOR-deficient mice can display changes in both mechanical and heat responses after tight ligation of the sciatic nerve (Nadal et al., 2006). Reciprocally, MOR-deficient mice can display changes in mechanical allodynia after spared nerve injury (Mansikka et al., 2004), and a MOR agonist can affect mechanical allodynia after spare nerve ligation (Guan et al., 2008).

While MORs are mediating the acute analgesic effect of the opiate morphine in a neuropathic pain condition, they are not necessary for the effect of chronic antidepressant drug treatment. On the contrary, DORs appear to be critical for nortriptyline relief of neuropathic allodynia. These opioid receptors are however not primary targets of the antidepressant drugs. Future research will thus be needed to understand the precise anatomical and molecular links between the primary action of nortriptyline on the aminergic system and the secondary recruitment of the endogenous opioid system.

Competing interests

The authors have no competing interests to declare.

Acknowledgements

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (Contracts UMR7168 and UPR3212), the University of Strasbourg (Contract UMR7168) and Neurex. Publication is supported by the European Commission (ENINET Project, Contract LHSM-CT-2005-019063). Y.B. is supported by a Neurex fellowship. We thank Elisabeth Waltisperger for technical assistance and Stéphane Doridot for animal care and genotyping.

References

- Attal N, Cruccu G, Haanpaa M, Hansson P, Jensen TS, Nurmikko T, et al. EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain. *Eur J Neurol* 2006;13(11):1153–69.
- Benbouzid M, Choucair-Jaafar N, Yalcin I, Waltisperger E, Muller A, Freund-Mercier MJ, et al. Chronic, but not acute, tricyclic antidepressant treatment alleviates neuropathic allodynia after sciatic nerve cuffing in mice. *Eur J Pain* 2008a;12(8):1008–17.
- Benbouzid M, Gaveriaux-Ruff C, Yalcin I, Waltisperger E, Tessier LH, Muller A, et al. Delta-opioid receptors are critical for tricyclic antidepressant treatment of neuropathic allodynia. *Biol Psychiatr* 2008b;63(6):633–6.
- Benbouzid M, Pallage V, Rajalu M, Waltisperger E, Doridot S, Poisbeau P, et al. Sciatic nerve cuffing in mice: a model of sustained neuropathic pain. *Eur J Pain* 2008c;12(5):591–9.
- Dworkin RH, O'Connor AB, Backonja M, Farrar JT, Finnerup NB, Jensen TS, et al. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain* 2007;132(3):237–51.
- Fuchs PN, Lariviere WR, Balinsky M, Melzack R. Acute amitriptyline treatment produces non-opioid-mediated analgesia in the formalin and bee venom tests. *Pathophysiology* 1996;3(4):227–31.
- Fuchs PN, Roza C, Sora I, Uhl G, Raja SN. Characterization of mechanical withdrawal responses and effects of mu-, delta- and kappa-opioid agonists in normal and mu-opioid receptor knockout mice. *Brain Res* 1999;821(2):480–6.
- Gaveriaux-Ruff C, Karchewski LA, Hever X, Matifas A, Kieffer BL. Inflammatory pain is enhanced in delta opioid receptor-knockout mice. *Eur J Neurosci* 2008;27(10):2558–67.
- Ghelardini C, Galeotti N, Bartolini A. Antinociception induced by amitriptyline and imipramine is mediated by alpha2A-adrenoceptors. *Jpn J Pharmacol* 2000;82(2):130–7.
- Gray AM, Spencer PS, Sewell RD. The involvement of the opioidergic system in the antinociceptive mechanism of action of antidepressant compounds. *Br J Pharmacol* 1998;124(4):669–74.
- Guan Y, Johaneck LM, Hartke TV, Shim B, Tao YX, Ringkamp M, et al. Peripherally acting mu-opioid receptor agonist attenuates neuropathic pain in rats after L5 spinal nerve injury. *Pain* 2008;138(2):318–29.
- Hao JX, Yu W, Xu XJ. Evidence that spinal endogenous opioidergic systems control the expression of chronic pain-related behaviors in spinally injured rats. *Exp Brain Res* 1998;118(2):259–68.
- Holdridge SV, Cahill CM. Spinal administration of a delta opioid receptor agonist attenuates hyperalgesia and allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Eur J Pain* 2007;11(6):685–93.
- Kabli N, Cahill CM. Anti-allodynic effects of peripheral delta opioid receptors in neuropathic pain. *Pain* 2007;127(1–2):84–93.
- Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C. Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog Neurobiol* 2002;66(5):285–306.
- Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. *Pain* 2008;137(3):473–7.
- Loh HH, Liu HC, Cavalli A, Yang W, Chen YF, Wei LN. Mu opioid receptor knockout in mice: effects on ligand-induced analgesia and morphine lethality. *Brain Res Mol Brain Res* 1998;54(2):321–6.
- Mansikka H, Zhao C, Sheth RN, Sora I, Uhl G, Raja SN. Nerve injury induces a tonic bilateral mu-opioid receptor-mediated inhibitory effect on mechanical allodynia in mice. *Anesthesiology* 2004;100(4):912–21.
- Marchand F, Alloui A, Chapuy E, Hernandez A, Pelissier T, Ardid D, et al. The antihyperalgesic effect of venlafaxine in diabetic rats does not involve the opioid system. *Neurosci Lett* 2003a;342(1–2):105–8.
- Marchand F, Alloui A, Chapuy E, Jourdan D, Pelissier T, Ardid D, et al. Evidence for a monoamine mediated, opioid-independent, antihyperalgesic effect of venlafaxine, a non-tricyclic antidepressant, in a neurogenic pain model in rats. *Pain* 2003b;103(3):229–35.
- Marchand F, Ardid D, Chapuy E, Alloui A, Jourdan D, Eschaliere A. Evidence for an involvement of supraspinal delta- and spinal mu-opioid receptors in the antihyperalgesic effect of chronically administered clomipramine in mononeuropathic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2003c;307(1):268–74.
- Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, et al. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 1996;383(6603):819–23.
- McGaraughty S, Honore P, Wismer CT, Mikusa J, Zhu CZ, McDonald HA, et al. Endogenous opioid mechanisms partially mediate P2X3/P2X2/3-related antinociception in rat models of inflammatory and chemogenic pain but not neuropathic pain. *Br J Pharmacol* 2005;146(2):180–8.
- Mico JA, Ardid D, Berrocoso E, Eschaliere A. Antidepressants and pain. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27(7):348–54.
- Mosconi T, Kruger L. Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy: ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations. *Pain* 1996;64(1):37–57.
- Moulin DE, Clark AJ, Gilron I, Ware MA, Watson CP, Sessle BJ, et al. Pharmacological management of chronic neuropathic pain – consensus statement and guidelines from the Canadian Pain Society. *Pain Res Manage* 2007;12(1):13–21.
- Nadal X, Banos JE, Kieffer BL, Maldonado R. Neuropathic pain is enhanced in delta-opioid receptor knockout mice. *Eur J Neurosci* 2006;23(3):830–4.
- Ortega-Alvaro A, Acebes I, Saracibar G, Echevarria E, Casis L, Mico JA. Effect of the antidepressant nefazodone on the density of cells expressing mu-opioid receptors in discrete brain areas processing sensory and affective dimensions of pain. *Psychopharmacology (Berl)* 2004;176(3–4):305–11.
- Pick CG, Paul D, Eison MS, Pasternak GW. Potentiation of opioid analgesia by the antidepressant nefazodone. *Eur J Pharmacol* 1992;211(3):375–81.
- Pitcher GM, Ritchie J, Henry JL. Nerve constriction in the rat: model of neuropathic, surgical and central pain. *Pain* 1999;83(1):37–46.
- Pradhan AA, Becker JA, Scherrer G, Tryoen-Toth P, Filliol D, Matifas A, et al. In vivo delta opioid receptor internalization controls behavioral effects of agonists. *PLoS ONE* 2009;4(5):e5425.
- Qiu C, Sora I, Ren K, Uhl G, Dubner R. Enhanced delta-opioid receptor-mediated antinociception in mu-opioid receptor-deficient mice. *Eur J Pharmacol* 2000;387(2):163–9.
- Reichenberg K, Gaillard-Plaza G, Montastruc JL. Influence of naloxone on the antinociceptive effects of some antidepressant drugs. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1985;275(1):78–85.
- Scherrer G, Imamachi N, Cao YQ, Contet C, Mennicken F, O'Donnell D, et al. Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. *Cell* 2009;137(6):1148–59.
- Schreiber S, Backer MM, Pick CG. The antinociceptive effect of venlafaxine in mice is mediated through opioid and adrenergic mechanisms. *Neurosci Lett* 1999;273(2):85–8.
- Schreiber S, Bleich A, Pick CG. Venlafaxine and mirtazapine: different mechanisms of antidepressant action, common opioid-mediated antinociceptive effects – a possible opioid involvement in severe depression? *J Mol Neurosci* 2002;18(1–2):143–9.
- Schuller AG, King MA, Zhang J, Bolan E, Pan YX, Morgan DJ, et al. Retention of heroin and morphine-6 beta-glucuronide analgesia in a new line of mice lacking exon 1 of MOR-1. *Nat Neurosci* 1999;2(2):151–6.
- Sora I, Takahashi N, Funada M, Ujike H, Revay RS, Donovan DM, et al. Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(4):1544–9.
- Sora I, Li XF, Funada M, Kinsey S, Uhl GR. Visceral chemical nociception in mice lacking mu-opioid receptors: effects of morphine, SNC80 and U-50, 488. *Eur J Pharmacol* 1999;366(2–3):R3–5.
- Su X, Gebhart GF. Effects of tricyclic antidepressants on mechanosensitive pelvic nerve afferent fibers innervating the rat colon. *Pain* 1998;76(1–2):105–14.
- Valverde O, Mico JA, Maldonado R, Mellado M, Gibert-Rahola J. Participation of opioid and monoaminergic mechanisms on the antinociceptive effect induced by tricyclic antidepressants in two behavioural pain tests in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatr* 1994;18(6):1073–92.
- Wei H, Panula P, Pertovaara A. A differential modulation of allodynia, hyperalgesia and nociception by neuropeptide FF in the periaqueductal gray of neuropathic rats: interactions with morphine and naloxone. *Neuroscience* 1998;86(1):311–9.
- Yalcin I, Choucair-Jaafar N, Benbouzid M, Tessier LH, Muller A, Hein L, et al. Beta(2)-adrenoceptors are critical for antidepressant treatment of neuropathic pain. *Ann Neurol* 2009a;65(2):218–25.
- Yalcin I, Tessier LH, Petit-Demouliere N, Doridot S, Hein L, Freund-Mercier MJ, et al. Beta2-adrenoceptors are essential for desipramine, venlafaxine or reboxetine action in neuropathic pain. *Neurobiol Dis* 2009b;33(3):386–94.

II. Rôle des récepteurs opioïdes *Kappa* dans l'effet thérapeutique d'un antidépresseur tricyclique

1. Introduction

Précédemment, nous avons démontré que les DOR, contrairement aux MOR, étaient indispensables à l'effet antiallodymique des antidépresseurs. Une étude récente a également démontré pharmacologiquement que les KOR pouvaient avoir un rôle puisque l'injection aiguë de l'antagoniste Nor-Binaltorphimine (nor-BNI) bloquait l'action antiallodymique d'un traitement prolongé par un antidépresseur tricyclique (Benbouzid et al., 2008a). Notons que cet effet est observé seulement avec une dose de 5 mg/kg, et non avec une dose de 2 mg/kg, et 30 minutes après administration de l'antagoniste. Dans le but de confirmer cette étude, c'est-à-dire afin d'évaluer précisément l'implication des KOR dans l'effet antiallodymique d'un traitement prolongé par un antidépresseur, nous avons utilisé des souris déficientes pour le récepteur opioïde KOR. Nos résultats montrent que, tout comme les MOR, les KOR ne semblent pas jouer un rôle notable dans l'effet thérapeutique des antidépresseurs. Nous montrons également 30 minutes après son administration que la nor-BNI n'est pas sélectif des seuls KOR. En conclusion, nos résultats semblent indiquer que les DOR sont les seuls représentants du « versant opioïdergique » impliqués dans le mécanisme d'action antiallodymique d'un antidépresseur dans un modèle murin de douleur neuropathique.

2. Matériel et méthode

La synthèse de la lignée de souris déficientes pour les KOR a été préalablement décrite (Simonin et al., 1998) et ces souris ont été croisées en retour sur un fond C57BL/6J sur au moins 10 générations. Les expériences sont conduites sur des mâles d'environ 8-9 semaines, de génotype KOR^{+/+} et KOR^{-/-}, obtenus par croisement d'hétérozygotes. Concernant les expériences comportementales, elles sont menées selon le même schéma expérimental que précédemment. Ainsi, pour toute information sur le protocole expérimental, il faut se référer au paragraphe « materials and method » de la publication relative aux MOR. Brièvement, deux semaines après l'induction de la neuropathie, les animaux Cuff et Sham bénéficient d'un traitement de trois semaines de nortriptyline (5 mg/kg) ou de solution saline. Durant ces 5

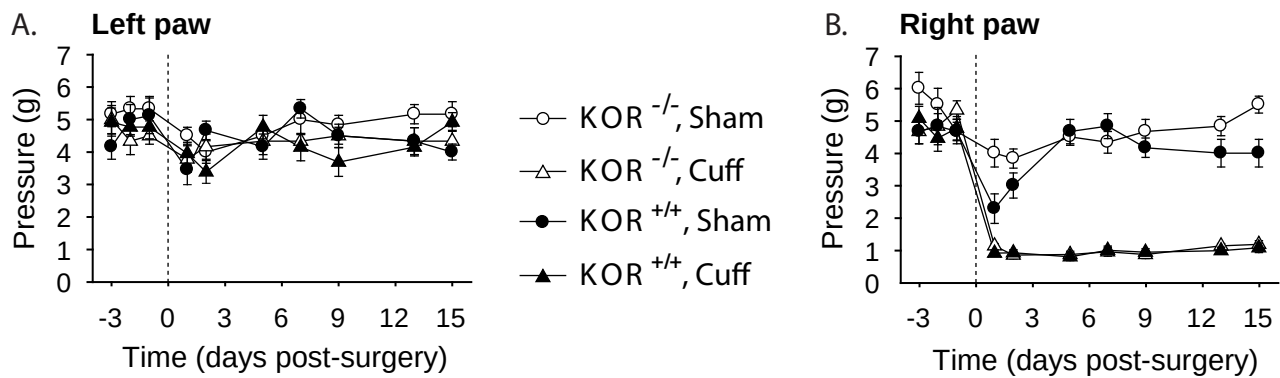


Figure B1. Consequence of cuff implantation in Wild-type and in KOR-deficient mice.

Adult male mice underwent surgery for unilateral cuff implantation around the main branch of the right sciatic nerve. Sham animals underwent the same surgical procedure without cuff implantation. The mechanical allodynia was tested using the von Frey hairs. (A) The cuff-implantation did not affect the mechanical threshold of paw contralateral to cuff implantation (left paw). (B) However, it induced an ipsilateral (right paw) allodynia in both wild-type (KOR^{+/+}, n=13) and KOR-deficient (KOR^{-/-}, n=12) mice. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

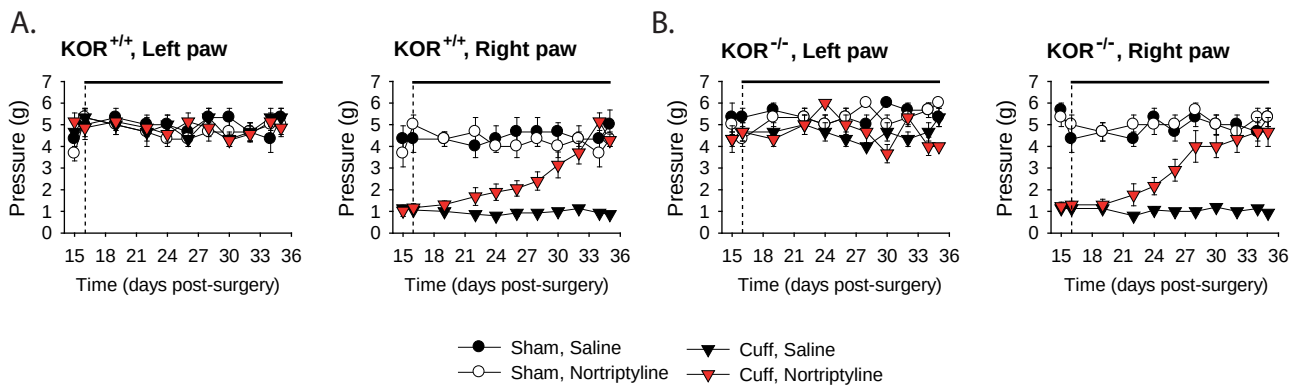


Figure B2. Nortriptyline treatment of neuropathic allodynia.

Two weeks after cuff implantation, the daily treatment with nortriptyline (5 mg/kg, i.p. twice a day) or its saline control (0.9 % NaCl) started and was maintained for 3 weeks. The hindpaw mechanical threshold was tested before the morning drug injection, using von Frey filaments. (A) In wild-type mice the treatments did not affect the mechanical threshold of the contralateral paw, but chronic nortriptyline suppressed the ipsilateral cuff-induced allodynia. (B) Similar results were observed in KOR-deficient mice. (n=6 for the different Sham groups, n=6-7 for the different Cuff groups). Data are expressed in mean $\pm$ SEM.

semaines, les seuils de sensibilité mécaniques sont évalués et à l'issue de ces 5 semaines les animaux reçoivent des injections aiguës de solution saline, de naltrindole (5 mg/kg) ou de nor-BNI (5 mg/kg).

3. Résultats

Sensibilité mécanique.

Les souris déficientes pour les KOR ne présentent pas de différence de seuil de sensibilité mécanique basal comparées au phénotype sauvage (**Figure B1**). La chirurgie sur les animaux Sham n'affecte pas le seuil de retrait de la patte et l'implantation du manchon autour du nerf sciatique induit une allodynie mécanique ipsilatérale qui est présente aussi bien chez les souris sauvages que déficientes en KOR (Interaction temps $\times$ chirurgie : ANOVA mesures répétées KOR^{+/+}, $p < 0,05$ et KOR^{-/-}, $p < 0,05$) (**Figure B1 B**). Aucune différence n'est relevée dans l'intensité de l'allodynie mécanique en fonction de la présence ou de l'absence des KOR (Effet du génotype : ANOVA mesures répétées, $p > 0,4$).

Effet d'un antidépresseur tricyclique : nortriptyline.

Deux semaines après l'induction de la neuropathie, les traitements soit avec la nortriptyline (5mg/kg) soit avec une solution saline (0,9% NaCl) débutent. Les souris bénéficient d'administrations intrapéritonéales biquotidiennes et sont testées le matin avant l'injection. Nous avons déjà reporté que ce traitement par un antidépresseur ne possédait aucun effet antalgique aigu et que le délai thérapeutique nécessaire à l'obtention d'un effet antiallodynique était d'environ 10 à 12 jours (Benbouzid et al., 2008a; Yalcin et al., 2009a). De la même façon, un traitement à la nortriptyline soulage l'allodynie mécanique induite par la pose du manchon chez les souris sauvages après 10 jours de traitement (Interaction temps $\times$ chirurgie $\times$ traitement: KOR^{+/+}, ANOVA mesures répétées, $p < 0,001$) (**Figure B2 A**). Le même effet antiallodynique est également présent chez des souris déficientes pour les KOR (Interaction temps $\times$ chirurgie $\times$ traitement: KOR^{-/-}, ANOVA mesures répétées, $p < 0,001$) (**Figure B2 B**). Dans les deux cas, le traitement à la nortriptyline supprime l'allodynie neuropathique sans affecter les seuils de réponse des animaux contrôles (Sham).

Effet aigu d'un antagoniste opioïde DOR : naltrindole.

Nous avons testé les conséquences d'une administration aiguë d'un antagoniste des DOR, la naltrindole (5 mg/kg), chez des souris déficientes pour les KOR et chez des souris sauvages.

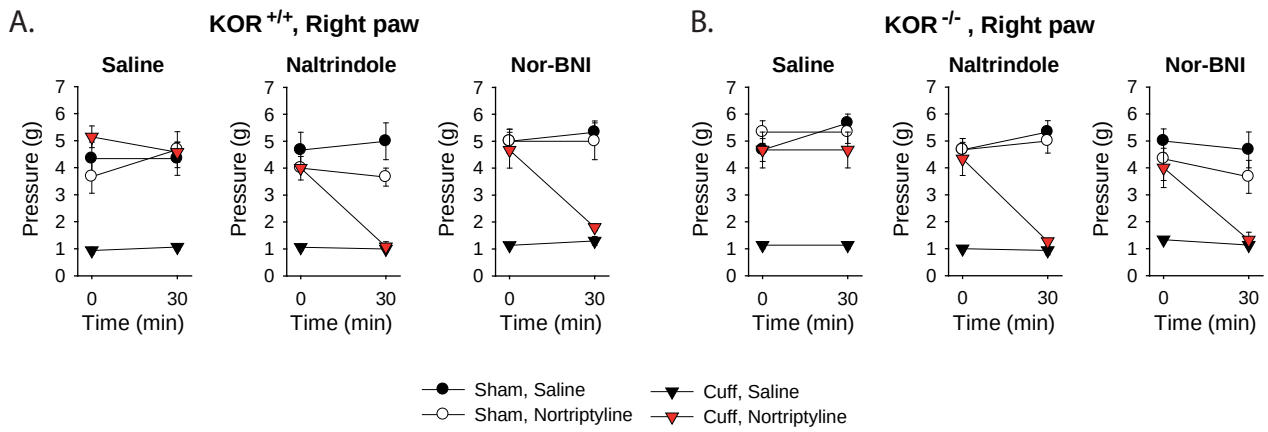


Figure B3. Effect of the DOR and KOR antagonists.

After 3 weeks of treatment with either nortriptyline or saline, the mice received an acute injection of saline (s.c.), of the DOR antagonist naltrindole (5 mg/kg, s.c.) or of the KOR antagonist Nor-BNI (5 mg/kg, s.c.). The nociceptive mechanical threshold was tested before and 30 min after these acute injections. (A) While acute saline injection did not affect the paw withdrawal threshold, the naltrindole or Nor-BNI injections induced a relapse of the allodynia in neuropathic wild-type mice treated by nortriptyline. No effect of naltrindole or Nor-BNI was observed in sham mice or in saline-treated neuropathic mice. (B) Similar results were obtained in KOR-deficient mice. (n=6 for the different Sham groups, n=6-7 for the different Cuff groups). Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Après trois semaines de traitement par la nortriptyline, l'injection aiguë de naltrindole supprime totalement l'effet thérapeutique du traitement (ANOVA mesures répétées KOR^{+/+}, $p < 0,01$ et KOR^{-/-}, $p < 0,01$) (**Figure B3 A et B**). Cet effet, mesuré 30 minutes après l'injection sous-cutanée de naltrindole, est observé à la fois chez les souris sauvages et déficientes pour les KOR. Nous avons également contrôlé que l'administration de naltrindole *per se* n'avait aucun effet sur les seuils de sensibilité mécanique des animaux contrôles (Sham) ou neuropathiques (Cuff) traités avec la solution saline.

Effet aigu d'un antagoniste opioïde KOR : nor-binaltorphimine.

Au vu des résultats contradictoires obtenus avec les approches pharmacologiques (Benbouzid et al., 2008a) et génétiques (données présentes), nous avons décidé de tester l'effet d'une administration aiguë d'un antagoniste KOR, la nor-BNI (5 mg/kg), chez des souris déficientes pour le KOR et chez des souris sauvages. Suite à trois semaines de traitement avec la nortriptyline, l'injection aiguë de nor-BNI bloque l'effet thérapeutique du traitement. De manière surprenante, cet effet est observable chez les souris sauvages et déficientes pour les KOR (ANOVA mesures répétées KOR^{+/+}, $p < 0,05$ et KOR^{-/-}, $p < 0,05$) (**Figure B3 A et B**) lorsqu'il est mesuré 30 minutes après l'injection sous-cutanée de nor-BNI.

4. Discussion

Lors de ces travaux, nous avons étudié l'impact des KOR sur un traitement prolongé par la nortriptyline dans un modèle murin de douleur neuropathique. Nous avons démontré que les KOR ne jouaient pas un rôle primordial dans l'effet antiallodynique de l'antidépresseur tricyclique et que l'antagoniste DOR supprimait l'action thérapeutique de la nortriptyline indépendamment de la présence des récepteurs opioïdes KOR. Enfin, nous avons mis en évidence de manière surprenante que l'antagoniste KOR bloque en aigu l'effet antiallodynique de la nortriptyline chez des souris déficientes en KOR, ceci remettant en cause sa sélectivité pour des procédures aiguës.

Des seuils de sensibilité mécanique similaires sont observés chez les souris sauvages et déficientes pour les KOR, ce qui est en accord avec certaines données de la littérature (Xu et al., 2004). D'autres études, par contre, détectent un léger abaissement du seuil de sensibilité mécanique chez les souris déficientes pour les KOR (Gaveriaux-Ruff et al., 2008). Ces différences pourraient être liées à l'utilisation des filaments de Von Frey, puisque dans notre

cas les lignes de base oscillent entre 4 et 6 g alors que dans le cas où une différence est visible les lignes de base sont comprises entre 0,6 et 0,9 g, ceci concerne aussi bien les souris sauvages que déficientes pour les MOR, DOR ou KOR. Notons également, que ces mêmes auteurs détectent aussi bien une diminution de la sensibilité thermique (Gaveriaux-Ruff et al., 2008) qu'aucun effet (Simonin et al., 1998) chez les souris déficientes pour les KOR comparées au phénotype sauvage. Ceci pourrait être en partie expliqué par l'utilisation de tests thermiques différents.

Suite à l'induction de la neuropathie, l'intensité de l'allodynie mécanique est similaire pour les deux génotypes. Ces résultats suggèrent que les KOR ne jouent pas un rôle critique dans le contrôle physiopathologique de l'allodynie neuropathique mesurée dans ce modèle animal. Ces résultats sont différents de ceux de la littérature. En effet, une aggravation bilatérale de l'allodynie mécanique a pu être observée chez les souris déficientes pour les KOR comparées au phénotype sauvage dans un modèle de ligature du nerf sciatique (Xu et al., 2004). Les données pharmacologiques vont également dans ce sens, puisque l'administration aiguë de nor-BNI augmente l'allodynie mécanique (Hao et al., 1998; Obara et al., 2003; Xu et al., 2004). Toutefois, ces administrations sont intrathécale (Obara et al., 2003) ou intrapéritonéale à la dose de 10 mg/kg (Hao et al., 1998; Xu et al., 2004) soit deux fois supérieure à celle utilisée dans nos protocoles. Ces résultats différents pourraient aussi être liés au modèle de ligature du nerf sciatique, sans doute plus drastique que la compression exercée par le manchon dans notre modèle.

Comme observé chez les souris sauvages, le bénéfice thérapeutique d'un traitement prolongé par un ATC est observé chez les souris déficientes pour les KOR. Le délai d'action thérapeutique ne semble pas affecté par la présence ou l'absence des KOR. Ces résultats suggèrent que les KOR ne sont pas nécessaires à l'effet antiallodynique de la nortriptyline. Par contre, un antagoniste DOR bloque l'action thérapeutique de la nortriptyline chez les souris sauvages ou déficientes pour les KOR. Ceci conforte donc les données précédentes et cela apporte une preuve supplémentaire au recrutement du système opioïdergique endogène et plus particulièrement des DOR au cours d'un traitement prolongé à la nortriptyline. Même si les KOR ne semblent pas jouer un rôle prépondérant dans l'action antiallodynique de la nortriptyline dans le traitement de la douleur neuropathique, les divergences entre les résultats pharmacologiques et génétiques obtenus au sein du laboratoire méritent d'être discutées. En effet, il a été montré qu'une administration aiguë d'un antagoniste KOR bloquait l'effet antiallodynique de la nortriptyline (Benbouzid et al., 2008a). Par contre, en utilisant les souris

déficiences pour les KOR, nous n'avons observé aucune différence sur le délai d'action ou l'intensité thérapeutique d'un traitement prolongé à la nortriptyline. Cette différence pourrait s'expliquer par un manque de sélectivité de la nor-BNI dans nos conditions expérimentales, c'est la raison pour laquelle nous avons testé cet antagoniste chez les souris déficientes pour les KOR. Nous avons effectivement constaté que la nor-BNI supprimait en aigu l'action de la nortriptyline aussi bien chez les souris sauvages que déficientes pour les KOR. La sélectivité de la nor-BNI est très forte pour les KOR *in vitro* (Birch et al., 1987; Endoh et al., 1992), cependant, son profil d'antagoniste sélectif n'est pas forcément maintenu *in vivo* (Birch et al., 1987; Hao et al., 1998). En effet, l'action antagoniste de la nor-BNI sur les KOR semble dépendre d'une composante temporelle (Endoh et al., 1992; Butelman et al., 1993). Ainsi, dans le test du pincement de la queue chez la souris, 30 minutes après son administration, la nor-BNI bloque l'analgésie due à la morphine ou au fentanyl, mais pas celle provoquée par un agoniste KOR, le U50488H. Cette inhibition sélective du KOR n'apparaît que progressivement et se stabilise deux heures après l'injection. Dans le même temps, son action non sélective diminue pour disparaître entre deux et quatre heures après injection (Endoh et al., 1992). Un autre exemple concerne la douleur abdominale induite par l'injection d'acide acétique. La nor-BNI exerce un effet inhibiteur plus important 24 heures après son administration plutôt qu'une heure après (Endoh et al., 1992). Au vu des données de la littérature, nous pouvons donc envisager que la nor-BNI soit relativement peu sélectif durant les deux premières heures qui suivent son administration, ce qui expliquerait le blocage de l'effet de la nortriptyline *via* les DOR. Il ne deviendrait spécifique pour les KOR que durant les heures suivantes, ce qui expliquerait son manque d'effet sur l'antiallodynie induite par la nortriptyline huit heures après l'injection (données préliminaires). Ces hypothèses restent toutefois à confirmer par d'autres manipulations de la sélectivité pharmacologique de la nor-BNI.

Même si la pharmacologie dirigée contre le KOR n'est pas toujours claire, il semble que les KOR ne soient pas nécessaires à l'effet antiallodynique d'un traitement prolongé à la nortriptyline. Les DOR apparaissent ainsi comme les seuls représentants opioïdiques réellement impliqués dans le soulagement de l'allodynie neuropathique par un antidépresseur tricyclique.

III. Rôle du système opioïdergique dans l'effet thérapeutique des β_2 -mimétiques

1. Introduction

Même si l'influence du système opioïdergique endogène dans l'effet antiallodynique des antidépresseurs semble nécessaire, peu d'études se sont intéressées à l'implication de ce système dans l'effet des agonistes β_2 -adrénergiques (β_2 -AR). Cependant, une étude relate que l'administration aiguë de naltrindole chez des animaux neuropathiques traités de manière prolongée par un β_2 -mimétique entraîne une réapparition de l'allodynie neuropathique (Yalcin et al., 2010). Cela suggère, tout comme dans le traitement par un antidépresseur, le recrutement en aval des récepteurs opioïdes DOR. Cette spécificité de l'implication des DOR dans l'action thérapeutique des agonistes β_2 -AR reste tout de même à confirmer en utilisant des souris déficientes pour les récepteurs opioïdes DOR, MOR et KOR.

2. Matériel et méthode

Les lignées de souris déficientes pour les MOR, KOR ou DOR ont été préalablement décrites (Matthes et al., 1996; Simonin et al., 1998; Filliol et al., 2000) et ces souris ont été croisées en retour sur un fond C57BL/6J pour au moins 10 générations. Les expériences sont conduites sur des mâles d'environ 8-9 semaines. Les expériences comportementales sont menées selon le même schéma expérimental que précédemment (paragraphe dédié à l'étude des MOR ou des KOR). Ainsi, pour toute information liée au protocole expérimental, il faut se référer au paragraphe « materials and method » de la publication relative aux MOR.

3. Résultats

Effet d'un traitement prolongé par un agoniste β_2 -adrénergique : la terbutaline.

La pose d'un manchon de polyéthylène autour de la branche principale du nerf sciatique induit une allodynie mécanique et ipsilatérale évaluée par la méthode des filaments de von Frey chez les souris sauvages (Interaction temps $\times$ chirurgie : ANOVA mesures répétées, $p < 0,001$) (**Figure B4 A**). Nous avons étudié les conséquences d'un traitement au long cours par

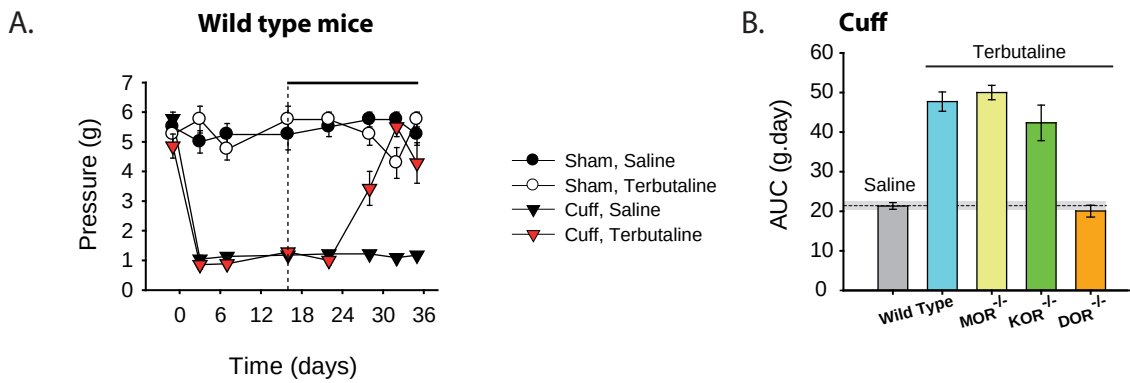


Figure B4. Effect of terbutaline treatment on neuropathic allodynia in wild-type and MOR-, KOR- or DOR-deficient mice.

Adult male mice underwent surgery for unilateral cuff implantation around the main branch of the right sciatic nerve. Sham animals underwent the same surgical procedure without cuff implantation. The mechanical allodynia was tested using the von Frey hairs. (A) Chronic treatment with terbutaline (0.5 mg/kg) suppressed the cuff-induced mechanical allodynia, while a saline solution had no therapeutic effect. (B) Area under curve (AUC) from post-surgical day 16 (first day of treatment) until the end of the treatment. Data are presented for cuff Wild type under saline and terbutaline treatment, and for cuff MOR-, KOR-, or DOR-deficient mice under terbutaline treatment. (n=8 for the different Sham groups, n=9-12 for the different Cuff groups). Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

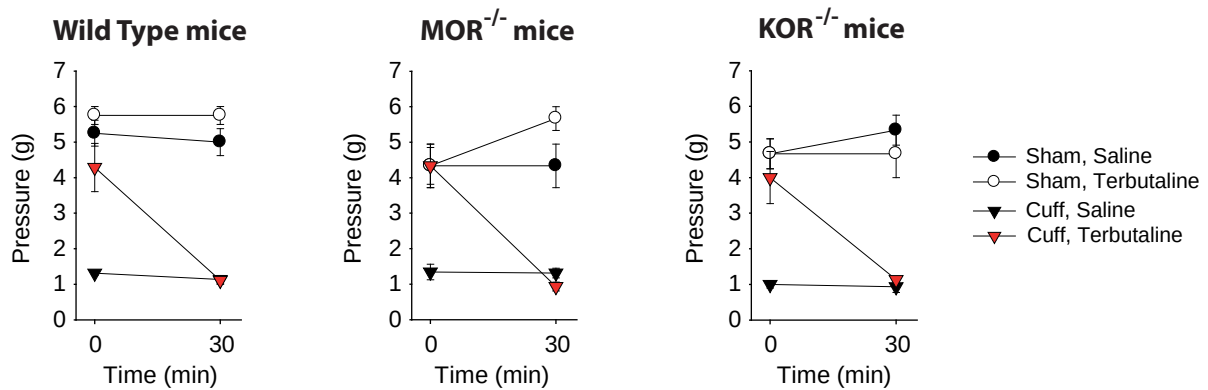


Figure B5. Effect of the DOR antagonist naltrindole.

After 3 weeks of treatment with either nortriptyline or saline, the mice received an acute injection of the DOR antagonist naltrindole (5 mg/kg, s.c.). The nociceptive mechanical threshold was tested before (0 min) and 30 min after these acute injections. The naltrindole injection induced a relapse of the allodynia in neuropathic wild-type, MOR- and KOR-deficient mice treated by terbutaline. No effect of naltrindole was observed in sham mice or in saline-treated neuropathic mice. (n=6-8 for the different Sham groups, n=6-12 for the different Cuff groups). Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

la terbutaline (0,5 mg/kg). De la même façon que pour un antidépresseur (Benbouzid et al., 2008a; Yalcin et al., 2009a), ce traitement prolongé par la terbutaline supprime l'allodynie induite par la neuropathie après environ 12 jours de traitement par comparaison au traitement salin chez les souris sauvages (Interaction temps $\times$ chirurgie $\times$ traitement : ANOVA mesures répétées, $p < 0,001$ (**Figure B4 A**). Le traitement n'a, cependant, aucun effet sur le seuil de sensibilité mécanique de la patte controlatérale des animaux neuropathiques ou sur le seuil de retrait des pattes des animaux contrôles (Sham).

Pour évaluer l'implication des récepteurs opioïdes dans ce traitement prolongé à la terbutaline, nous avons utilisé des lignées déficientes pour les MOR, les KOR ou les DOR ainsi que leur phénotype sauvage. Les résultats sont exprimés sous la forme d'aires sous la courbe (AUC), et correspondent à toute la période de traitement, c'est-à-dire du 16^{ème} au 35^{ème} jour postopératoire. La terbutaline a un effet antiallodynique chez les souris sauvages et celles déficientes pour les MOR ou les KOR (ANOVA à un facteur, $p < 0,001$) (**Figure B4 B**), sans que cette action antalgique ne diffère entre ces lignées (ANOVA à un facteur, $p > 0,2$) (**Figure B4 B**). Le délai thérapeutique reste également le même entre ces lignées (données non montrées). Par contre, le traitement à la terbutaline n'a aucun effet chez les souris neuropathiques déficientes pour le DOR.

Effet de la naltrindole sur l'action antiallodynique de la terbutaline.

Après trois semaines de traitement, une administration aiguë de naltrindole (5 mg/kg) supprime l'effet thérapeutique de la terbutaline sur l'allodynie mécanique chez des souris neuropathiques déficientes pour les MOR, les KOR ou leur phénotype sauvage (ANOVA mesures répétées MOR^{-/-} $p < 0,01$; KOR^{-/-} $p < 0,05$ et OR^{+/+} $p < 0,01$). L'injection de l'antagoniste DOR n'a, toutefois, aucun effet sur le seuil de sensibilité mécanique de la patte controlatérale des animaux neuropathiques ou sur le seuil de retrait des pattes des animaux contrôles (Sham) (**Figure B5**).

4. Discussion

Les antidépresseurs agissent contre la douleur neuropathique à travers un mécanisme dépendant des β_2 -AR (Yalcin et al., 2009b) et le délai d'action thérapeutique est similaire entre les antidépresseurs et les β_2 -mimétiques (Yalcin et al., 2009a; Yalcin et al., 2010). Ces deux traitements sembleraient ainsi recruter les mêmes effecteurs secondaires suite à la stimulation du β_2 -AR. Les études précédentes ont rapporté que seuls les DOR, mais pas les

MOR ou les KOR, seraient recrutés dans le mécanisme antiallodynique des antidépresseurs dans le traitement de la douleur neuropathique. Les résultats obtenus ici montrent, par une approche génétique, qu'un traitement prolongé avec un β_2 -mimétique soulage l'allodynie neuropathique chez des souris neuropathiques sauvages, déficientes pour les MOR ou les KOR, mais reste inefficace chez des souris dont les DOR sont absents. De plus, par une approche pharmacologique, nous montrons qu'un antagoniste DOR supprime de façon aiguë l'effet antiallodynique de la terbutaline chez des souris neuropathiques sauvages ou déficientes pour les MOR ou les KOR. Si quelques doutes subsistaient quant à l'implication éventuelle des KOR dans l'action thérapeutique des antidépresseurs tricycliques, avec l'utilisation d'un agoniste β_2 -AR, nous montrons que le seul protagoniste opioïdergique ayant un rôle dans l'effet antiallodynique est le récepteur DOR. Toutes ces données suggèrent que les agonistes β_2 -AR ou les antidépresseurs partagent un mécanisme commun pour supprimer l'allodynie neuropathique. Ces récepteurs opioïdes DOR ne sont cependant pas les cibles directes du traitement par un antidépresseur ou un β_2 -mimétique. Il est nécessaire afin d'élucider précisément ce mécanisme d'antiallodynie, de comprendre le lien anatomique et moléculaire entre la stimulation du système adrénergique et le recrutement en aval du système opioïdergique endogène.

IV. Localisation de l'effet opioïdergique des antidépresseurs tricycliques et des β_2 -mimétiques

1. Introduction

Le système opioïdergique joue un rôle prépondérant dans les contrôles inhibiteurs de la douleur (Mogil et al., 2000; Gaveriaux-Ruff and Kieffer, 2002; Dierich and Kieffer, 2004) et les études préalablement réalisées au sein du laboratoire plaident en faveur de son implication dans l'effet thérapeutique des antidépresseurs ou des agonistes β_2 -AR dans la prise en charge de la douleur neuropathique (Benbouzid et al., 2008a; Yalcin et al., 2009a; Yalcin et al., 2010). Néanmoins, ces dernières études n'ont pas recherché la localisation de l'action du système opioïde. Même s'il a été proposé que l'action thérapeutique des injections répétées de clomipramine sur l'allodynie neuropathique soit liée à l'activation des MOR dans la moelle épinière et des DOR au niveau supraspinal (Marchand et al., 2003a), leur localisation reste peu étudiée. Pour déterminer la localisation de l'effet opioïdergique, nous nous sommes basés

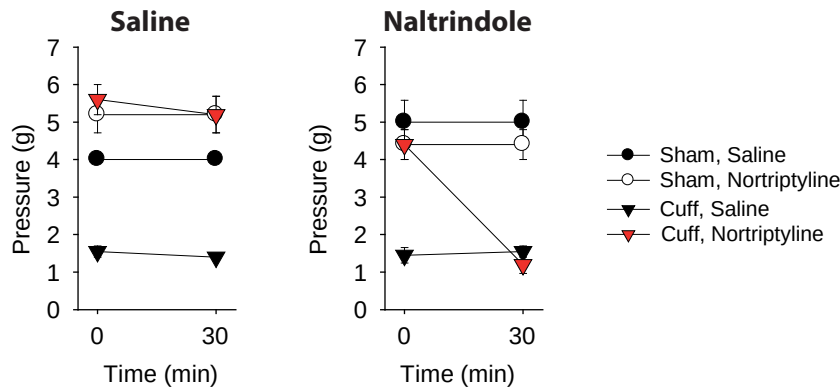


Figure B6. Effect of the naltrindole intrathecal administration.

After 3 weeks of treatment with either nortriptyline or saline, the mice received an acute lumbar intrathecal injection of the DOR antagonist naltrindole. The nociceptive mechanical threshold was tested before (0 min) and 30 min after these acute injections. The naltrindole injection induced a relapse of the allodynia in neuropathic mice treated by nortriptyline. No effect of naltrindole was observed in sham mice or in saline-treated neuropathic mice. (n=4-5 for the different Sham groups, n=4-5 for the different Cuff groups). Data are expressed in mean $\pm$ SEM.

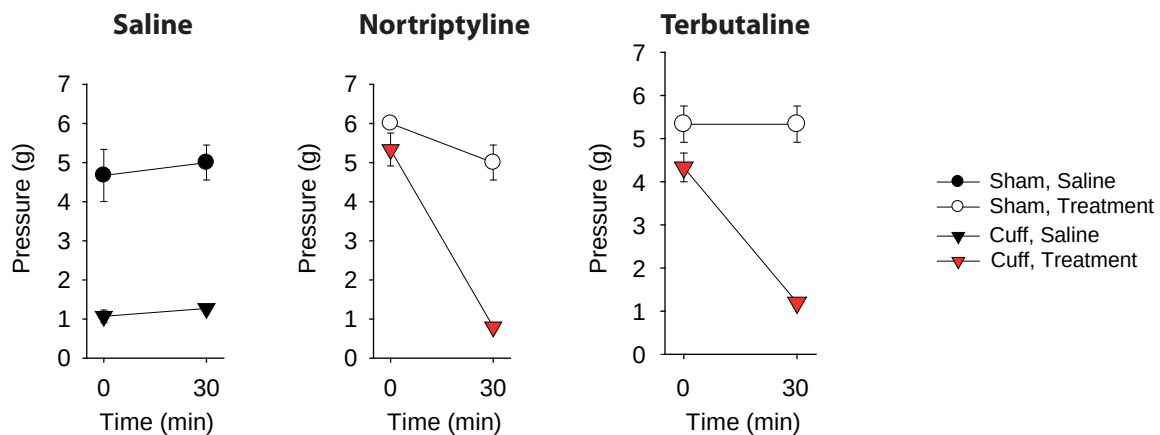


Figure B7. Effect of an opioid receptor antagonist: naloxone methiodide.

After 3 weeks of treatment with either nortriptyline, terbutaline or saline, the mice received an acute injection of an opioid receptor antagonist naloxone methiodide which do not cross the brain blood barrier (5 mg/kg, sc). The nociceptive mechanical threshold was tested before (0 min) and 30 min after these acute injections. The naloxone methiodide injection induced a relapse of the allodynia in neuropathic mice treated by nortriptyline and terbutaline. No effect of naloxone methiodide was observed in sham mice or in saline-treated neuropathic mice. (n=6 for the different Sham and Cuff groups). Data are expressed in mean $\pm$ SEM.

sur des résultats de l'équipe, montrant que l'action antiallodynique d'un antidépresseur ou d'un agoniste β_2 -AR était supprimée par une administration intrathécale, mais pas intracérébroventriculaire d'un antagoniste β_2 -AR (Choucair-Jaafar et al., 2009; Yalcin et al., 2009b). Ces résultats suggèrent que l'action thérapeutique d'un antidépresseur pourrait avoir lieu dans la moelle épinière ou dans les ganglions rachidiens. De plus, lors de ce travail de thèse nous avons envisagé que le bourgeonnement du système nerveux sympathique dans les ganglions rachidiens pouvait servir de substrat anatomique à l'action antiallodynique d'un antidépresseur tricyclique. Par analogie d'action, les agonistes β_2 -AR pourraient également jouer leur rôle antiallodynique au sein du ganglion rachidien, site dans lequel ces agonistes exercent une action moléculaire (cf. partie A page 87). Le but de ces travaux préliminaires est de rechercher à l'aide d'outils pharmacologiques si le recrutement du système opioïdergique endogène a également lieu dans les ganglions rachidiens.

2. Matériel et méthode

Le schéma expérimental est le même que celui utilisé auparavant. Deux semaines après l'induction de la neuropathie, un traitement de trois semaines à la nortriptyline (5 mg/kg), la terbutaline (0,5 mg/kg) ou avec une solution saline débute. A l'issue de ces cinq semaines postopératoires, les animaux reçoivent des injections aiguës intrapéritonéales de naloxone methiodide (5 mg/kg), un antagoniste des récepteurs opioïdes qui ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique, ou des injections aiguës intrathécales de naltrindole (5 μ g dans 10 μ L) avec respectivement leurs injections contrôles salines.

3. Résultats

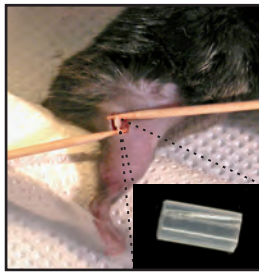
Effet d'une administration intrathécale de naltrindole.

Suite à un traitement prolongé à la nortriptyline, une administration aiguë intrathécale au niveau lombaire d'un antagoniste DOR, la naltrindole (5 μ g dans 10 μ L), supprime l'effet antiallodynique de l'ATC (ANOVA mesures répétées, $p < 0,001$) (**Figure B6**). Cette injection est sans effet chez les souris contrôles (Sham). De plus, l'injection intrathécale de solution saline n'altère pas les seuils de sensibilité des animaux (**Figure B6**).

Modèle murin de douleur neuropathique



Nerf sciatique



Allodynie mécanique

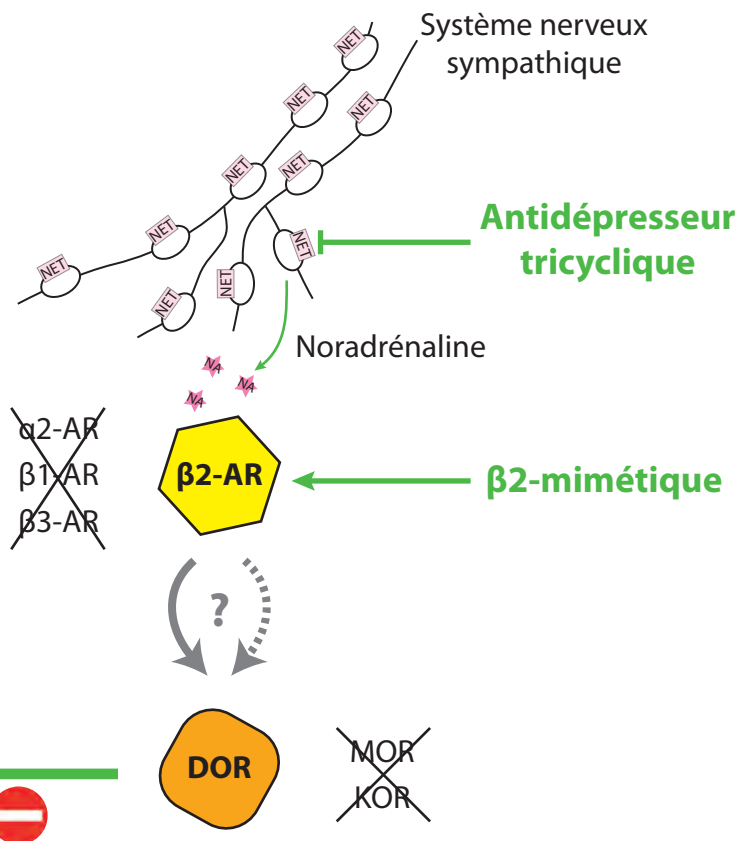


Figure B8. Couplage entre les récepteurs $\beta 2$ -AR et DOR impliqués dans l'action antiallodygique d'un antidépresseur tricyclique ou d'un $\beta 2$ -mimétique dans les ganglions rachidiens.

Effet d'une administration d'un antagoniste opioïde périphérique.

Après trois semaines de traitement par la nortriptyline ou la terbutaline, une administration aiguë d'un antagoniste des récepteurs opioïdes ne traversant pas la barrière hémato-encéphalique, la naloxone methiodide (5 mg/kg), abolit l'effet antiallodynique de l'ATC ou du β_2 -mimétique (ANOVA mesures répétées, $p < 0,01$) (**Figure B7**). Cette injection est sans effet chez les souris contrôles (Sham). De plus, l'injection intrathécale de solution saline n'altère pas les seuils de sensibilité des animaux (**Figure B7**).

4. Discussion

Après avoir déterminé la localisation tissulaire et cellulaire du recrutement du système adrénergique, et plus particulièrement des β_2 -AR lors de l'action thérapeutique d'un ATC ou d'un β_2 -mimétique, il paraissait légitime de localiser les sites d'action du système opioïdérique. Ces travaux préliminaires ont montré que l'administration lombaire intrathécale de naltrindole bloquait l'action de la nortriptyline, ce qui suggère que le recrutement opioïdérique a lieu dans la moelle épinière ou dans le ganglion rachidien. Cependant, ces études restent à étendre au traitement par l'agoniste β_2 -AR. D'autre part, nous avons également montré qu'une administration aiguë de naloxone methiodide supprimait l'effet antiallodynique d'un traitement prolongé par la nortriptyline ou la terbutaline, ce qui laisse penser que l'action du système opioïdérique a lieu en périphérie, dans le nerf ou le ganglion rachidien. Ainsi, tout comme le système adrénergique, la mise en jeu du système opioïdérique endogène, et notamment des DOR, dans l'action thérapeutique des antidépresseurs ou des β_2 -mimétiques contre la douleur neuropathique aurait lieu dans les ganglions rachidiens. En plus de sa mise en évidence pharmacologique et génétique, le couplage entre β_2 -AR et DOR, élément primordial dans l'action antiallodynique d'un antidépresseur ou d'un β_2 -mimétique, semble avoir un support anatomique commun: le ganglion rachidien (**Figure B8**). Les études prochaines devront d'une part compléter et confirmer les résultats préliminaires présentés ici et d'autre part identifier le lien moléculaire nécessaire au bon fonctionnement de ce couplage. Citons comme lien potentiel les peptides opioïdes qui peuvent être libérés suite à une stimulation des β_2 -AR par un agoniste ou par libération de noradrénaline provenant du système sympathique (Binder et al., 2004; Busch-Dienstfertig and Stein, 2010).

DISCUSSION GENERALE

Dans l'étude du mécanisme d'action des antidépresseurs dans un modèle murin de douleur neuropathique, nous nous sommes initialement posés deux questions à savoir, où se déroule l'action thérapeutique ? et quels sont les protagonistes mis en jeu dans le mécanisme physiopathologique de la douleur neuropathique et de son traitement par les antidépresseurs ? Concernant la localisation de l'effet thérapeutique des antidépresseurs ou des agonistes β_2 , nous concluons que cet effet antalgique a lieu principalement en périphérie, plus particulièrement dans les ganglions rachidiens. Nous avons également observé que les β_2 -AR étaient seulement portés par les cellules non neuronales de ces ganglions.

A propos du mécanisme physiopathologique sous-jacent, nous avons vu que l'augmentation de l'expression du TNF- α dans les ganglions rachidiens jouait un rôle essentiel dans le maintien de la douleur neuropathique. L'inhibition de l'action du TNF- α , soit directement par l'etanercept, soit indirectement par un antidépresseur ou un agoniste β_2 adrénergique, est primordiale pour obtenir un effet antiallodynique dans notre modèle de douleur neuropathique.

Enfin, concernant les acteurs impliqués dans l'action thérapeutique, nous connaissons l'implication des composantes noradrénergique et opioïdérique avec respectivement les β_2 -AR et les DOR. Pour le système opioïdérique, des interrogations subsistaient sur l'implication des autres récepteurs, notamment les MOR et les KOR. Nous avons démontré que l'action antiallodynique des antidépresseurs et des agonistes β_2 adrénergiques ne nécessitent ni les MOR ni les KOR.

Certains aspects des résultats ont déjà été discutés dans les chapitres précédents. Dans cette discussion générale nous reviendrons plus largement sur **A)** les hypothèses physiopathologiques de la douleur neuropathique ; **B)** le ganglion rachidien : lieu d'action des antidépresseurs ; **C)** la relation entre β_2 -AR, DOR et TNF- α ; **D)** la notion de balance inter- et intracellulaire entre la douleur neuropathique et son traitement par les antidépresseurs ; **E)** la nécessité d'un délai d'action thérapeutique.

A. Hypothèses physiopathologiques des douleurs neuropathiques périphériques

I. Douleur neuropathique et neuroinflammation

L'inflammation est souvent associée à des états douloureux. En effet, les lésions tissulaires engendrent la production d'un grand nombre de médiateurs qui, outre leur action excitatrice propre, contribuent à la sensibilisation des fibres afférentes périphériques. Les neurotransmetteurs et neuromodulateurs périphériques sont nombreux, d'où le terme souvent utilisé de « soupe inflammatoire » (Edwards, 2005). Ils sont libérés à partir des tissus lésés, des cellules sanguines (plaquettes, polymorphonucléaires, mastocytes), des macrophages et à partir des terminaisons des fibres afférentes (substance P, CGRP). Parmi ces substances dites algogènes, on distingue les ions K^+ et H^+ , la sérotonine, les cytokines pro-inflammatoires, l'histamine, les prostaglandines ou encore la bradykinine. La neuroinflammation, quant à elle, est un terme plus restrictif se référant aux états inflammatoires présents dans le système nerveux (Myers et al., 2006).

Basé sur des études pharmacologiques et histologiques notamment des activations cellulaires différentielles en fonction du temps et du tissu, le décours temporel d'une douleur neuropathique peut se répartir sur deux périodes, avec le développement et le maintien de cette douleur. Chacune de celles-ci mettant en jeu vraisemblablement des mécanismes distincts. Durant les premiers jours suivant la lésion nerveuse, une démyélinisation axonale est observée avec recrutement des cellules non neuronales résidentes du tissu qui vont phagocyter les débris de myéline, libérer des substances algogènes comme la bradykinine ou les cytokines, ce qui conduira à augmenter la perméabilité vasculaire et à recruter d'autres leucocytes (Shubayev et al., 2006; Chattopadhyay et al., 2007). Une partie des communications cellulaires du tissu va se réaliser par l'intermédiaire des cytokines. Comme nous l'avons déjà mentionné dans la revue, durant ces premiers jours postopératoires, il y a la mise en place d'une cascade inflammatoire définie par l'augmentation de l'expression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires comme le $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$... Plus qu'un moyen de communication intercellulaire, les cytokines sont capables d'agir directement sur le neurone *via* leurs récepteurs spécifiques (Mehler and Kessler, 1995). Finalement, dans cette période précoce, nous constatons que les ingrédients nécessaires au développement d'une inflammation sont réunis. En plus des modifications d'activation cellulaire, au bout de deux

semaines postopératoires, l'expression tissulaire de la majorité des cytokines ayant pris part à l'initiation de la douleur revient à son état basal. Toutefois, après quelques semaines, c'est-à-dire lorsque la pathologie est installée, une « réactivation » de cytokines spécifiques a été décrite (Kleinschnitz et al., 2006), mais elle n'entraînerait pas de réapparition de la réponse inflammatoire. Dans le cas particulier du TNF- α , nos résultats sont relativement bien corrélés à ceux de la littérature dans le sens où nous n'avons observé après 5 semaines postopératoires que la seule augmentation de son expression génique et protéique, alors que celle d'autres cytokines comme IL-6, IL-1 β n'étaient pas modifiées. De plus, même si la forme soluble du TNF- α semble être un acteur important de l'inflammation (Rongione et al., 1997), son précurseur membranaire semble également avoir un rôle dans la physiopathologie de la douleur neuropathique (Peng et al., 2006). En effet, nos résultats ont démontré un rôle prépondérant du TNF- α membranaire dans le maintien de la douleur neuropathique, et dans la limite de détection des techniques utilisées, nous n'avons pas mesuré de forme soluble que ce soit au niveau local dans le ganglion rachidien ou au niveau systémique. Ceci semble en accord avec des études cliniques qui montrent une augmentation du TNF- α dans les cellules de Schwann du nerf sural lésé mais pas de modification des taux circulants de TNF- α chez des patients neuropathiques (Empl et al., 2001). Ainsi, une localisation précise du TNF- α pourrait rendre compte de phénomènes d'interactions et/ou activations intracellulaires privilégiées entre les cellules exprimant le TNF- α et les cellules possédant son récepteur. En fait, pour décrire de façon temporo-mécanistique la douleur neuropathique, nous pouvons dire que les événements précoces corrélés comportementalement au développement de la douleur neuropathique sont associés à des réactions de type neuroinflammatoires généralisées et que les événements tardifs corrélés comportementalement au maintien de la douleur neuropathique sont quant à eux associés en partie à des réactivations particulières de cytokines localisées.

Au vu de ces données, le facteur temps apparaît comme un élément déterminant dans le choix de la cible thérapeutique. En effet, la pratique clinique courante relate que les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ont peu ou pas d'effet sur des patients neuropathiques (Dworkin et al., 2007; Moulin et al., 2007; Attal et al., 2010). Avec l'exposé préclinique précédent, il n'est pas surprenant qu'en clinique sur des pathologies installées depuis des mois ou des années, ces traitements AINS n'aient aucun effet. Ces données sont corroborées par le fait qu'une hypersensibilité mécanique chez un animal neuropathique soit atténuée par injections d'AINS un jour mais pas 2 semaines après lésion nerveuse (Zhao et al., 2000). Par contre, lors de douleurs inflammatoires chroniques, la physiopathologie décrite concerne une

inflammation locale, c'est-à-dire une libération de substances algogènes qui peut être associée à une destruction cartilagineuse dans l'exemple de l'ostéoarthrite ou de la polyarthrite rhumatoïde (Crofford et al., 2000; Sarzi-Puttini et al., 2010). Une des recommandations cliniques courantes de ces pathologies reposent sur l'utilisation d'AINS, d'anti-inflammatoires stéroïdiens locaux dans le cas de l'ostéoarthrite, voire de stratégie anti-cytokine pour la polyarthrite rhumatoïde ou la spondylarthrite ankylosante (Zhang et al., 2007b; Silva et al., 2010). Outre leur effet sur la douleur neuropathique, les antidépresseurs ATC ou IRSN sont également connus pour avoir une action dans le traitement de douleurs inflammatoires (Jones et al., 2005; Chappell et al., 2009), indépendamment de leur effet antidépresseur (Ash et al., 1999). D'autre part l'utilisation de β_2 -mimétiques comme le salbutamol diminue la symptomatologie et la libération des cytokines pro-inflammatoires associées dans un modèle arthritique (Malfait et al., 1999). L'utilisation d'IRS, inefficaces contre la douleur neuropathique, a démontré leur effet anti-inflammatoire dans l'arthrite chez le patient et l'animal (Sacre et al., 2010; Krishnadas and Cavanagh, 2011). De plus, une diminution de la production de cytokines a été observée sur des cultures de membranes synoviales de patients arthritiques traités par un IRS (Sacre et al., 2010). Ces études suggèreraient un potentiel thérapeutique anti-inflammatoire aux IRS dans les pathologies chroniques inflammatoires. Bien qu'ils aient une action anti-inflammatoire, les IRS ne présentent pas d'efficacité dans le traitement de la douleur neuropathique, suggérant ainsi que le substrat nécessaire à leur action thérapeutique serait absent ou non disponible en condition neuropathique.

Finalement, que ce soit d'un point de vue physiopathologique en comparant douleur neuropathique et inflammatoire, ou d'un point de vue thérapeutique même si des mécanismes d'action semblent communs, la douleur neuropathique chronique et installée ne serait pas une condition neuroinflammatoire *per se*.

II. Douleur neuropathique et canaux ioniques

Lors de douleur neuropathique l'implication des canaux ioniques est associée avec des phénomènes de douleur provoquée, mais la démonstration est moins claire dans les cas de douleur spontanée. En effet, dans les différents modèles animaux, la majorité des techniques utilisées pour les mesures de sensibilité ne peuvent rendre compte que de la douleur provoquée. En clinique, l'administration de lidocaïne améliore la douleur spontanée,

cependant, la lidocaïne peut inhiber à la fois la transmission nerveuse normale et pathologique, ceci ne constitue donc pas une preuve de l'implication directe des canaux ioniques dans la douleur neuropathique. Par ailleurs, l'utilisation préclinique de méthodes électrophysiologiques a permis de montrer que la fréquence des décharges ectopiques était diminuée par blocage de canaux ioniques (Lee et al., 2005). Ainsi, lors d'une lésion nerveuse la genèse de décharges ectopiques en périphérie peut constituer un signal primaire dans le développement de la douleur neuropathique en conduisant à des phénomènes de sensibilisation centrale (Devor, 2006).

Si la plupart des études se sont intéressées aux hypersensibilités consécutives à une lésion périphérique, dans le cas d'atteinte centrale comme des lésions médullaires, une augmentation de l'expression dans la corne dorsale de la moelle épinière du canal sodium Nav1.3 (Hains et al., 2006), normalement non détecté chez l'animal adulte (Felts et al., 1997), est alors observée. Les neurones spinaux de la corne dorsale projettent par le faisceau spinothalamique aux neurones des noyaux du thalamus, cette surexpression du canal sodium Nav1.3 est également détectée dans les neurones thalamiques (Hains et al., 2005). Dans les deux cas, cette surexpression est associée à une augmentation de l'activité spontanée, c'est-à-dire une augmentation de la fréquence de décharges des neurones (Hains et al., 2005, 2006).

En fait, dans le mécanisme pathologique de la douleur neuropathique, que ce soit suite à une lésion périphérique ou centrale, le site de lésion subit des changements de l'expression de canaux ioniques et ces modifications peuvent se répercuter sur les neurones suivants de la chaîne. Pour déterminer l'implication réelle de ces canaux ioniques, différentes études ont analysé leurs expressions géniques ou protéiques en fonction du temps. Suite à une lésion nerveuse, des modifications de l'expression des canaux sodium et calcium ont lieu dans les premiers temps, c'est-à-dire de quelques heures à une semaine après l'induction de la neuropathie (Kim et al., 2001; Xiao et al., 2002). En fait, pour reprendre une terminologie déjà usitée, cela correspondrait aux événements précoces de la douleur neuropathique avec en règle générale une augmentation de l'expression de ces canaux, donc vraisemblablement une augmentation de la neurotransmission excitatrice. Ensuite, un pic de l'expression de ces canaux sodium et calcium est observé après deux semaines postopératoires (Dib-Hajj et al., 1999; Newton et al., 2001; Xiao et al., 2002), et de façon similaire à l'étude menée sur les cytokines, un retour à la ligne de base est constaté plusieurs semaines après l'induction (Dib-Hajj et al., 1996; Xiao et al., 2002), ce qui correspond à des événements tardifs. De manière intéressante, nos résultats préliminaires concernant l'expression génique des canaux sodium Nav1.3, Nav1.7 et Nav1.8 et calcium Cav2.1 dans une neuropathie installée (cinq semaines

postopératoires), n'indiquent aucune variation d'expression dans les ganglions rachidiens d'animaux neuropathiques.

Ainsi, les mécanismes physiopathologiques de la douleur neuropathique impliquant les canaux ioniques semblent avoir un décours temporel superposable à celui des cytokines avec des périodes précoce et tardive. Toutefois, il est nécessaire de souligner que ce n'est pas parce que l'étude de l'expression génique ne détecte pas de modification, qu'il n'y a pas de variation de la protéine.

III. Douleur neuropathique et système nerveux sympathique

De nombreuses observations cliniques supportent l'idée que les afférences primaires possèdent une sensibilité pour les catécholamines soit circulantes ou libérées par le système nerveux sympathique. Cette sensibilité adrénergique a été décrite en clinique dans diverses étiologies neuropathiques. En effet, la plupart des patients dont la douleur dépend du système sympathique décrivent une intense douleur suite à une injection de noradrénaline dans le territoire sous-lésionnel, tandis qu'une diminution notable de la douleur est mesurée suite à une administration systémique de bloqueur adrénergique comme la phentolamine (Ali et al., 2000). Chez le patient amputé neuropathique, l'administration périneuromale, c'est-à-dire au site de lésion, de noradrénaline ou d'adrénaline à dose physiologique induit une intense douleur (Chabal et al., 1992; Raja, 1998). De plus, chez des patients neuropathiques post-herpétiques, l'application de noradrénaline sur le dermatome en aval de la lésion nerveuse provoque une augmentation de la douleur spontanée et de l'hyperalgésie mécanique dynamique (Choi and Rowbotham, 1997). De même, chez des patients dont la douleur dépend du système sympathique, l'administration intraveineuse de phentolamine diminue la douleur, ce qui n'est pas le cas avec un β -bloquant le propranolol (Raja et al., 1991; DelleMijn et al., 1994). Ces données suggèrent que la composante sympathique de ces douleurs ne serait pas liée aux β -AR. Finalement, des blocs sympathiques peuvent être réalisés sur les troncs nerveux périphériques des dermatomes atteints, donc sans affecter directement le ganglion rachidien concerné, pour soulager les symptômes neuropathiques (Boas, 1998). Que ce soit au site de lésion ou sur le dermatome atteint, il semble que la noradrénaline ait une action directe sur les afférences sensorielles, en recrutant les α -AR. Par contre, aucune étude clinique ne démontre une action pathologique dans le ganglion rachidien. Seule la présence d'un

bourgeoisement sympathique suggère une intervention possible dans la douleur neuropathique (Shinder et al., 1999).

De nombreuses études précliniques ont recherché la localisation réelle de la composante sympathique de la douleur neuropathique. Beaucoup d'entre elles ont utilisées des administrations systémiques ce qui touchent potentiellement les troncs nerveux et les ganglions rachidiens. Les interventions sur le système sympathique incluent des approches chirurgicales et pharmacologiques systémiques ou locales. Dans un certain nombre de modèles, la sympathectomie chirurgicale ou par administration intrapéritonéale de guanéthidine diminue les symptômes neuropathiques (Kim and Chung, 1991; Shir and Seltzer, 1991). De manière intéressante, suite à une lésion nerveuse périphérique, l'application locale de noradrénaline augmente l'hyperalgésie mécanique et cet effet est bloqué par une sympathectomie préalable (Tracey et al., 1995). Concernant les conséquences fonctionnelles, les fibres afférentes primaires contenues dans le nerf peuvent être excitées suite à une stimulation électrique de la chaîne sympathique. Cet effet peut être mimé par injection de noradrénaline ou d'adrénaline et bloqué par un antagoniste α -adrénergique (Habler et al., 1987). Dans le ganglion rachidien, les efférences sympathiques dérivant du rameau communicant gris et innervant notamment les vaisseaux sanguins, envahissent le ganglion rachidien suite à une lésion nerveuse périphérique (McLachlan et al., 1993). Des études comportementales ont démontré que ce bourgeoisement sympathique dans les ganglions rachidiens pouvait, selon l'étiologie neuropathique proximale (proche des ganglions rachidiens) ou distale (au niveau des nerfs périphériques), être associé à des symptômes douloureux (Pertin et al., 2007). De plus, tout comme observé en clinique, les récepteurs adrénergiques impliqués semblent être les α_2 -AR (Chen et al., 1996). Ce couplage entre neurones sensoriels et fibres sympathiques a lieu essentiellement autour des somas des fibres de type A (Ramer and Bisby, 1998), mais même en condition physiopathologique l'activité de décharge des neurones pré- ou post-ganglionnaires est insuffisante en soi pour mener à l'activation des somas neuronaux (Michaelis et al., 2000). Une sympathectomie ne modifie pas l'activité ectopique des neurones du ganglion rachidien chez des rats neuropathiques (Liu et al., 2000). Suite à une lésion nerveuse, une augmentation de l'expression des α_2 -AR dans les somas sensoriels est détectée (Birder and Perl, 1999). Cependant, cette surexpression n'est que transitoire et disparaît après quelques semaines, c'est-à-dire au fur et à mesure que l'arborisation sympathique se met en place dans le ganglion rachidien. Ainsi, peu d'activation neuronale peuvent être générée par les concentrations de noradrénaline présente dans le ganglion rachidien (Lopez de Armentia et al., 2003).

Finale­ment, d'après les données cliniques et précliniques, l'implication du système nerveux sympathique dans les douleurs neuropathiques sympathique-dépendantes semble essentiellement avoir lieu le long des fibres sensorielles des troncs nerveux périphériques, comme en témoigne les effets thérapeutiques des blocs sympatholytiques utilisés en clinique. Si dans la plupart des cas de lésion nerveuse périphérique, le ganglion rachidien est envahi par un bourgeonnement sympathique, celui-ci n'apparaît pas être directement relié aux phénomènes d'activité électrique anormale des somas sensoriels associés aux comportements neuropathiques.

B. Le ganglion rachidien : lieu d'action d'un antidépresseur

I. Site d'action en fonction du traitement par les antidépresseurs

Les études cliniques et précliniques sont relativement unanimes pour dire que le système noradrénergique est prédominant dans l'effet thérapeutique des antidépresseurs dans la douleur neuropathique. Les sources de noradrénaline endogène sont au niveau central les contrôles inhibiteurs descendants spinaux ou les projections supraspinales des noyaux noradrénergiques et au niveau périphérique le système nerveux sympathique. Nous avons vu dans l'introduction que l'effet antalgique des antidépresseurs était majoritairement observé lors de manipulations intrathécales, c'est-à-dire atteignant la moelle épinière et le ganglion rachidien. La plupart des études ont utilisé des protocoles d'administration aiguë d'antidépresseur. Même si certains auteurs ont également utilisé une méthode d'escalade pharmacologique sur 24 heures, basée sur le mimétisme clinique des concentrations d'antidépresseurs circulants chez les patients (Wattiez et al., 2011), cela reste tout de même un protocole d'administration aigu, ne reflétant pas l'utilisation clinique courante.

L'effet antalgique aigu des ATC ou des IRSN, à dominante noradrénergique, serait dû à une action centrale par l'intermédiaire des contrôles descendants noradrénergiques et ceci par la stimulation des α_2 -AR. Ceci est conforté par les effets d'administrations intrathécales d'agonistes α_2 -AR spécifiques comme la clonidine qui améliorent les symptômes neuropathiques (Martin et al., 2006). Concernant les IRS, si leur administration prolongée ne présente pas d'effet antalgique, leur injection aigu intrathécale est suivie d'effets thérapeutiques contre la douleur neuropathique, qui disparaissent chez des souris transgéniques déficientes en neurones sérotoninergiques centraux ou avec une déplétion sérotoninergique centrale (Honda et al., 2006; Zhao et al., 2007b). L'IRS, dans son effet aigu, agirait donc dans la moelle épinière *via* les contrôles inhibiteurs sérotoninergiques.

Par contre, plus proche de la clinique, nous utilisons des administrations prolongées d'antidépresseurs et des études précédentes ont démontré le rôle prédominant des β_2 -AR (Yalcin et al., 2009b; Yalcin et al., 2009a). De plus, l'implication du système opioïdurgique et notamment des DOR a également été observée (Benbouzid et al., 2008a; Benbouzid et al., 2008c). Ainsi, selon le mode d'action, aigu ou prolongé, les antidépresseurs semblent avoir un mécanisme d'action différent, c'est-à-dire que les cibles directes comme les récepteurs

adrénergiques et les effecteurs secondaires comme les récepteurs opioïdes sont relativement distinctes.

Les études menées au sein du laboratoire ont montré que l'injection systémique d'un antagoniste des β_2 -AR ou des DOR bloquait l'effet antiallodynique d'un antidépresseur ou d'un β_2 -mimétique. Cependant, ces études ne renseignent pas sur la localisation de cet effet thérapeutique. A cette fin, des études utilisant des administrations intrathécales ont permis de cibler la région lombaire innervant le nerf sciatique. Toutefois, la distinction précise entre moelle épinière (SNC) et ganglion rachidien (SNP) ne peut être faite de cette manière. D'autre part, l'utilisation d'un antagoniste opioïde ne traversant pas la barrière hémato-encéphalique (Brown et al., 1983) a montré l'implication éventuelle du système nerveux périphérique, mais cela ne constitue pas une preuve absolue de l'effet périphérique. En effet, des perturbations de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique au niveau spinal peuvent apparaître suite à une lésion nerveuse périphérique (Gordh et al., 2006; Beggs et al., 2010). Elle devient perméable pour des molécules ou des cellules, notamment du système immunitaire, qui en condition physiologique ne sont pas capables d'atteindre le SNC (Grace et al., 2011). C'est pour cela que les expériences où la naloxone methiodide est administrée à cinq semaines postopératoires, doivent être considérées avec précaution. En condition neuropathique, aucune étude à ce jour n'a étudié le degré de pénétration de l'etanercept dans le SNC suite à une altération de la barrière hémato-encéphalique. La diffusion de l'etanercept, de par sa taille importante (150 kDa), est relativement inexistante dans le tissu nerveux sain à partir de la vascularisation (Zhou, 2005). Ainsi, tout comme avancé dans le cas de la naloxone methiodide, il est difficile de conclure avec cette seule étude quant à un effet périphérique.

Néanmoins, pour s'affranchir des altérations de la barrière hémato-encéphalique occasionnée suite à une lésion nerveuse périphérique, nous avons réalisé les lésions noradrénergiques avant d'induire la neuropathie et nous avons également utilisés différents sites d'administrations de la neurotoxine, au niveau soit périphérique soit central. Ainsi, en réalisant une sympathectomie deux semaines avant l'induction de la douleur neuropathique, nous avons observé qu'un traitement par un antidépresseur tricyclique n'a plus d'action thérapeutique, et ceci est corrélé histologiquement par la perte complète du bourgeonnement noradrénergique pathologique dans le ganglion rachidien. L'ensemble de ces expériences démontre que l'invasion du système nerveux sympathique dans le ganglion rachidien suite à une lésion nerveuse périphérique constitue le substrat endogène nécessaire à l'action thérapeutique d'un antidépresseur tricyclique. Dans ce contexte, un β_2 -mimétique agirait également dans le ganglion rachidien, en court-circuitant le recrutement du système nerveux

sympathique par stimulation directe des β_2 -AR. Dans le but d'étendre cette hypothèse, nos résultats seraient à généraliser à d'autres modèles traumatiques où un bourgeonnement sympathique dans le ganglion rachidien a été décrit (Pertin et al., 2007). Il est de plus à noter qu'un bourgeonnement sympathique dans le ganglion rachidien faisant suite à une lésion nerveuse périphérique, a aussi pu être observé chez des patients douloureux neuropathiques ne présentant pas de symptomatologie adrénergique (Shinder et al., 1999).

Si le ganglion rachidien apparaît comme le lieu d'action des antidépresseurs, il est intéressant d'envisager les cas où un traitement par les antidépresseurs reste inefficace, notamment suite à une infection par le VIH (Finnerup et al., 2010) ou à une lésion médullaire (Attal et al., 2009).

II. Antidépresseur et VIH

Les neuropathies sont les complications non infectieuses les plus communes d'une infection par le VIH (Pardo et al., 2001). En effet, plus de la moitié des individus infectés par le VIH vont développer des signes neuropathiques (Pardo et al., 2001; Schifitto et al., 2002). Même si la pathophysiologie de la neuropathie périphérique relative à cette infection reste peu connue, une des hypothèses mécanistiques avancée est la dégénérescence distale axonale (Pardo et al., 2001), mettant en jeu une infiltration macrophagienne (Bradley et al., 1998; Pardo et al., 2001) et les cellules de Schwann (Merrill and Chen, 1991; Keswani et al., 2003). En plus de ce recrutement cellulaire dans le nerf, une autre altération neuropathologique a pu être observée dans le ganglion rachidien, il s'agit du recrutement de cellules produisant des cytokines pro-inflammatoires et qui expriment des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité, autrement dit des cellules non neuronales du ganglion rachidien comme les macrophages, les lymphocytes T ou les cellules satellites gliales (Yoshioka et al., 1994; Nagano et al., 1996). De plus, des études cliniques ont démontré la présence exclusive de l'infection virale dans les cellules non neuronales du système nerveux, c'est-à-dire des cellules gliales ou immunitaires et non dans des neurones (Sharer et al., 1994; Lin et al., 1997; Saadati et al., 1999). En fait, ce serait des cellules non neuronales infectées qui produiraient des neuromédiateurs, notamment des cytokines conduisant au développement et au maintien de la neuropathie associée au VIH. Dans les cellules immunitaires, la production de cytokines (TNF- α ou IL-1 β) peut être induite par l'infection virale. Ces cytokines en retour peuvent, par des boucles de stimulation autocrine, amplifier la réplication et l'expression du VIH

notamment par le recrutement de la voie NF κ B (Israel et al., 1989; Osborn et al., 1989), ce qui maintiendrait le réservoir d'infection du VIH que sont les cellules non neuronales (Merrill and Chen, 1991; Merrill et al., 1999). Concernant l'aspect thérapeutique, deux explications peuvent être avancées pour comprendre l'inefficacité des antidépresseurs, soit l'absence du système nerveux sympathique donc une absence du substrat des antidépresseurs dans le ganglion rachidien auquel cas un β_2 -mimétique serait susceptible d'avoir un effet thérapeutique ; soit un dysfonctionnement des cellules portant les β_2 -AR dans le ganglion rachidien.

Même si aucune étude n'a pour l'instant démontré la présence ou l'absence de fibres sympathiques dans le ganglion rachidien, nous pouvons cependant faire le parallèle avec ce qui est déjà connu en termes de physiopathologie dans d'autres types de douleur neuropathique. Nous avons vu qu'une dégénérescence wallérienne avait lieu lors d'une neuropathie induite par le VIH, ce qui a été confirmé cliniquement (Ebenezer et al., 2007). De plus, il a été démontré expérimentalement que cette dégénérescence le long de l'axone est un préalable nécessaire au bourgeonnement noradrénergique pathologique dans le ganglion rachidien (Ramer et al., 1997), notamment grâce au recrutement de cellules non neuronales par l'intermédiaire de neurotrophines et de cytokines (Ramer et al., 1998b; Ramer et al., 1998a). Tout ceci suggère qu'une telle arborisation pourrait également avoir lieu lors d'une neuropathie associée à une infection par le VIH.

D'autre part, nous avons vu que les β_2 -AR sont essentiellement exprimés dans le ganglion rachidien par des cellules non neuronales. Or précédemment, il a été montré que le réservoir d'une infection par le VIH pourrait être ces mêmes cellules non neuronales, notamment par l'activation de la voie de transduction NF κ B. De plus, son activation dans les cellules non neuronales a été retrouvée comme facilitatrice de la douleur neuropathique par la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (Fu et al., 2010; Zang et al., 2010). Par opposition, le recrutement des β_2 -AR provoque en aval une augmentation de la voie AMPc/PKA. Des études préliminaires menées au laboratoire ont démontré qu'un inhibiteur de phosphodiesterases, qui augmente les taux d'AMPc, a le même effet thérapeutique qu'un antidépresseur ou un β_2 -mimétique. Ainsi, dans une même cellule les voies NF κ B et AMPc/PKA peuvent être recrutées mais de manière distincte, car l'augmentation de la voie AMPc/PKA inhibe la voie NF κ B (Ghosh et al., 1993; Takahashi et al., 2002). Une explication de l'inefficacité de recrutement des β_2 -AR reposerait sur l'auto-maintien de la charge virale, *via* l'activation de NF κ B et la production de cytokines qui empêcheraient l'activation de la voie AMPc/PKA dans les cellules non neuronales.

III. Antidépresseur et lésion médullaire

La douleur neuropathique est une condition très fréquemment observée après une lésion médullaire (Canavero and Bonicalzi, 2007). La symptomatologie rencontrée de douleurs spontanées ou évoquées est souvent comparable à celle observée lors de lésion nerveuse périphérique (Attal et al., 2009). Même si les antidépresseurs sont les molécules les plus utilisées lors de douleur neuropathique, les études cliniques concernant des patients avec une douleur centrale suite à une lésion médullaire n'ont pas suggéré d'efficacité de l'amitriptyline comparée au placebo (Cardenas and Felix, 2009). Cependant, d'autres études observent une efficacité de l'amitriptyline uniquement chez un sous-groupe de patients présentant une symptomatologie dépressive (Rintala et al., 2007), suggérant que l'efficacité analgésique de l'amitriptyline serait fortement liée à son effet antidépresseur. L'efficacité des antidépresseurs non tricycliques, comme la reboxétine (Canavero and Bonicalzi, 2001), le trazodone (Davidoff et al., 1987) ou encore la duloxétine (Vranken et al., 2011), n'a également pas été démontrée dans les douleurs neuropathiques centrales consécutives à une lésion médullaire. Par contre, l'administration épidurale de clonidine (agoniste α_2 -adrénergique) inhibe la sémiologie neuropathique des lésions médullaires (Glynn et al., 1986; Siddall et al., 1994).

Dans le cas de douleur neuropathique centrale post-lésion médullaire, le schéma pathologique spinal décrit est relativement similaire à celui des lésions nerveuses périphériques, c'est-à-dire une augmentation de la transmission excitatrice, une diminution de la transmission inhibitrice notamment monoaminergique et un recrutement de cellules gliales (astrocytes et microglie) et de leucocytes circulants (Hulsebosch et al., 2009). Cependant, quelques différences notables concernant des acteurs moléculaires existent entre pathologies neuropathiques centrale et périphérique (Berger et al., 2011). En effet, en particulier le TNF- α apparaît comme un élément important dans le maintien de la douleur neuropathique d'origine périphérique puisqu'il a été montré dans nos études ou d'autres (Sommer et al., 2001) qu'un traitement à l'etanercept soulage l'allodynie mécanique installée. En condition de lésion médullaire, le TNF- α semble ne jouer un rôle que dans le développement de la douleur neuropathique (Peng et al., 2006), puisque son inhibition par l'etanercept sur une douleur centrale installée est sans effet thérapeutique (Marchand et al., 2009).

Tout comme observé en clinique, chez l'animal, un traitement par un antidépresseur ne possède aucun effet thérapeutique suite à une lésion médullaire (Hama and Sagen, 2007). En

condition de lésion médullaire, le foyer primaire lésionnel est la moelle épinière et les ganglions rachidiens voisins ne semblent pas affectés. Ainsi, le manque d'effet thérapeutique des antidépresseurs pourrait s'expliquer par l'absence de modifications pathologiques utiles au traitement antidépresseur ou β_2 -mimétique, comme le bourgeonnement sympathique dans les ganglions rachidiens ou bien par le fait que les β_2 -AR des cellules non neuronales ganglionnaires soient moins fonctionnels. Si lors de lésion périphérique, attaquer la douleur neuropathique à sa source consiste à cibler le ganglion rachidien, lors de lésion centrale il conviendrait de cibler la moelle épinière. Analyser la physiopathologie induite dans la moelle épinière est donc un préalable nécessaire pour définir les acteurs thérapeutiques potentiels.

C. Lien entre β_2 -AR, DOR et TNF- α

Dans notre modèle de douleur neuropathique, un rôle indispensable des β_2 -AR a été observé dans l'effet antiallodynique des antidépresseurs (Yalcin et al., 2009b; Yalcin et al., 2009a) et leur seule stimulation est capable de produire un effet antalgique similaire aux antidépresseurs (Choucair-Jaafar et al., 2009; Yalcin et al., 2010). Dans le système nerveux central, les β_2 -AR sont majoritairement exprimés par les cellules gliales comme les astrocytes (Mantyh et al., 1995). En périphérie, les β_2 -AR sont connus pour être exprimés par les cellules immunitaires (Elenkov et al., 2000) et nous avons observé que tout comme les astrocytes, les cellules satellites gliales sont également capable d'exprimer les β_2 -AR. La stimulation des β_2 -AR par un agoniste ou la noradrénaline provoque classiquement une augmentation des taux d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et une activation de la protéine kinase A (PKA) (Elenkov et al., 2000; Junker et al., 2002). Ce mécanisme est étroitement régulé par les phosphodiesterases (PDE), enzymes de dégradation des nucléotides cycliques. Les PDE4 sont responsables de l'hydrolyse de l'AMPC formé lors de l'activation des récepteurs adrénergiques (McCahill et al., 2008). Ainsi l'utilisation d'inhibiteurs de phosphodiesterase de type 4 (iPDE), comme le rolipram a démontré un bénéfice thérapeutique dans différents modèles de douleur neuropathique (Ledeboer et al., 2006).

I. Lien entre β_2 -AR et DOR

Nous avons pu montrer que les β_2 -AR fonctionnels sont présents uniquement sur des cellules non neuronales, vraisemblablement les cellules satellites gliales du ganglion rachidien. D'autre part, les DOR semblent quant à eux majoritairement exprimés sur les afférences primaires (Mennicken et al., 2003). Des résultats préliminaires n'ont pas montré de variation d'expression génique des β_2 -AR ou des DOR dans le ganglion rachidien chez un animal neuropathique traité ou non par un ATC. Des données de la littérature observent une augmentation de l'expression protéique des DOR dans les ganglions rachidiens d'animaux neuropathiques et un recrutement accru de ces récepteurs au site de lésion périphérique (Kabli and Cahill, 2007). Un lien entre systèmes noradrénergique et opioïdergique existe. En effet, un traitement prolongé par un antidépresseur permet une augmentation de la synthèse de peptides opioïdes (Hamon et al., 1987). De même, la stimulation du β_2 -AR induisant une activation de la voie AMPC/PKA conduit à la synthèse de peptides opioïdes, notamment dans

des cellules non neuronales immunitaires (Binder et al., 2004). De manière intéressante, cette analgésie périphérique dépendante des cellules immunitaires est abolie après sympathectomie chimique ou l'administration d'antagoniste adrénergique (Binder et al., 2004; Machelska, 2011).

II. Lien entre β_2 -AR et TNF- α

Nous avons montré que l'expression du TNF- α , en particulier sa forme membranaire est augmentée dans le ganglion rachidien en condition neuropathique. De plus, un traitement prolongé avec un antidépresseur ou un β_2 -mimétique diminue son expression. A noter qu'un ATC n'a pas d'effet antiallodynique et ne diminue pas les taux de TNF- α chez des souris déficientes pour les β_2 -AR, suggérant un lien entre β_2 -AR et TNF- α .

En effet, la stimulation du β_2 -AR par un agoniste spécifique ou par la noradrénaline induit une diminution de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et une augmentation de la synthèse de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, et ceci par un mécanisme dépendant de l'activation de la voie AMPc/PKA (Elenkov et al., 2000). Des effets similaires sont observés chez des souris traitées par un iPDE (McCann et al., 2010), traitées avec un ATC (Selmeczy et al., 2003) ou déficientes pour le transporteur de la noradrénaline (NET) (Selmeczy et al., 2003).

Pour le traitement de la douleur neuropathique, nous avons également montré qu'une inhibition de la voie NF κ B est suffisante pour obtenir un effet antiallodynique. Ceci semble en accord avec les données de la littérature qui observent une activation de la voie NF κ B dans les cellules non neuronales, c'est-à-dire immunitaires et gliales, conduisant à la sécrétion de TNF- α par exemple (Ledeboer et al., 2005). Nous avons observé qu'un traitement ATC inhibe la voie NF κ B en augmentant l'expression de son répresseur endogène I κ B- α . De plus, la stimulation du β_2 -AR en augmentant les taux d'AMPc intracellulaire mène à une diminution de la voie NF κ B dans une même cellule (Takahashi et al., 2002) et de la même façon le rolipram diminue le recrutement de la voie NF κ B (Sanchez et al., 2005).

De manière intéressante, la neuropathie semble induire une activation directe de la voie NF κ B sans altérer l'expression d'I κ B. Par contre, l'action du traitement n'agit pas directement sur l'activation de la voie NF κ B, mais semble induire une augmentation de l'expression du répresseur endogène I κ B, ceci suggérant l'activation d'une voie parallèle et opposée à NF κ B.

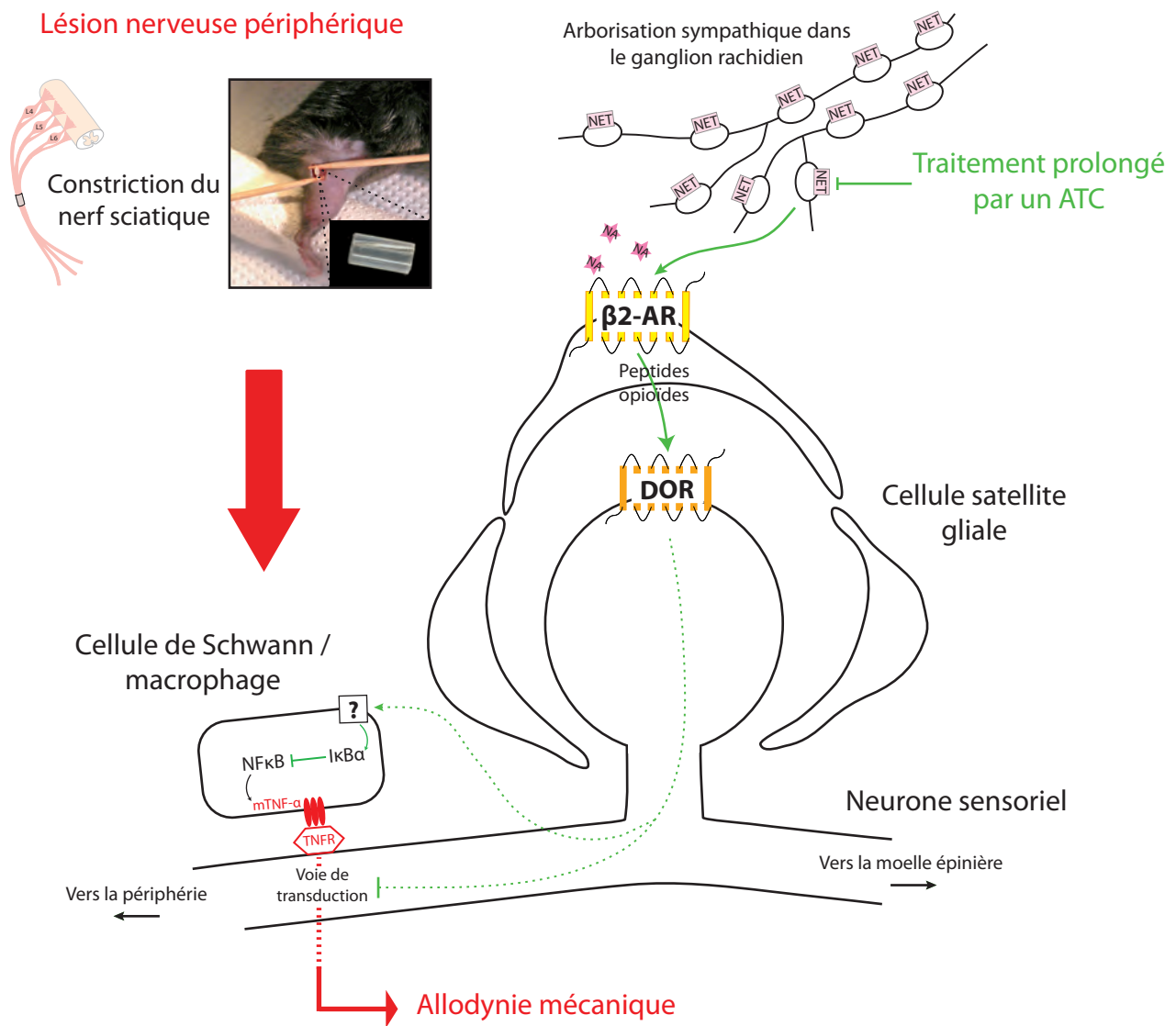


Figure C1. Représentation schématique du mécanisme d'action potentiel d'un antidépresseur tricyclique (ATC) dans le traitement de la douleur neuropathique.

III. Lien entre DOR et TNF- α

Les DOR sont exprimés essentiellement par les afférences primaires. Le TNF- α membranaire pour agir sur les neurones, recrute un récepteur, le TNFR1 qui est le seul récepteur exprimé par les neurones sensoriels (Schafers et al., 2008).

Nous avons vu précédemment un lien entre β_2 -AR/DOR et β_2 -AR/TNF- α . Qu'en est-il entre TNF- α et DOR ? Une étude observe qu'un traitement à la thalidomide (inhibiteur de la synthèse de TNF- α), en plus de diminuer les comportements neuropathiques, augmente les concentrations d'enképhalines dans la corne dorsale de la moelle épinière (George et al., 2000). Toutefois, une autre étude montre, dans un modèle d'arthrite chronique, que les effets thérapeutiques d'un traitement par la thalidomide ne sont pas modifiés par l'administration d'un antagoniste opioïde (Vale et al., 2006). Il est important ici de souligner que la stimulation des DOR sur les neurones sensoriels induit une inhibition de la voie AMPc/PKA car ces récepteurs sont couplés à une protéine G inhibitrice (Zhang and Pan, 2010). D'autre part, si de nombreuses voies de transduction comme les MAP kinases ont pu être décrites suite à l'activation du TNFR1, une étude relate que l'application de TNF- α active TNFR1 sur des neurones sensoriels et recrute la voie AMPc/PKA puisque son action est bloquée par un inhibiteur de la PKA (Zhang et al., 2002). Ainsi, les DOR et les TNFR1 auraient un rôle opposé dans les neurones sensoriels, respectivement antiallodynique et allodynique.

Finalement, avec les quelques acteurs connus et suspectés, nous pouvons proposer une hypothèse d'action simple de l'effet antiallodynique des ATC dans le traitement de la douleur neuropathique (**Figure C1**). Dans le ganglion rachidien, le recrutement des β_2 -AR indirectement par les ATC via le système nerveux sympathique ou indirectement par un agoniste spécifique conduit à l'activation de la voie de l'AMPc/PKA dans les cellules satellites gliales qui mènerait à la synthèse et à la libération de peptides opioïdes comme les enképhalines, lesquelles iraient ensuite stimuler les DOR présents sur les afférence primaires. Dans le même temps, cette stimulation des β_2 -AR conduit à une diminution de la synthèse de TNF- α membranaire qui diminuerait de l'activation du TNFR1. Cette hypothèse est valable dans le cas où les cellules satellites possédant des β_2 -AR fonctionnels sont également capables de libérer des peptides opioïdes.

Le mécanisme proposé reste cependant à confirmer par d'autres expériences. En effet, quelques points concernant notamment les différentes localisations cellulaires restent encore à éclaircir.

D. Concept de balance inter- et intracellulaire

De nombreuses interrogations subsistent encore sur la répartition cellulaire des différents acteurs. Cependant, en ne considérant que deux compartiments cellulaires l'un non neuronal et l'autre neuronal, nous pouvons revenir plus précisément sur la mise en jeu des différentes voies de transduction intracellulaire.

Lors d'une lésion nerveuse périphérique, des études comportementales et électrophysiologiques ont suggéré que l'activation de la voie AMPc/PKA joue un rôle important dans les processus douloureux de sensibilisation dans le neurone sensoriel (Taiwo et al., 1989; Aley and Levine, 1999). Par exemple, les prostaglandines par l'intermédiaire de leurs récepteurs augmentent l'excitabilité neuronale en activant la voie AMPc/PKA (Hingtgen et al., 1995). La même voie est impliquée dans l'augmentation de la fréquence de décharges des neurones lors de l'application de TNF- α (Zhang et al., 2002). Par contre, pour le compartiment non neuronal, il est généralement observé un recrutement de la voie NF κ B lors d'évènements pathologiques (Kaltschmidt and Kaltschmidt, 2009). En effet, la surexpression d'I κ B- α dans des cellules gliales diminue la libération de cytokines pro-inflammatoires, menant à l'atténuation des comportements neuropathiques (Meunier et al., 2007; Fu et al., 2010).

Nos données physiologiques obtenues *in vivo* dans le cadre de la douleur neuropathique semblent en accord avec d'autres travaux menés *in vitro* sur des cultures de cellules cérébrales. En effet, sur ces cultures cellulaires, un traitement ATC diminue la synthèse de cytokines pro-inflammatoires par inhibition de la voie NF κ B dans les cellules gliales, et ceci en empêchant la dégradation du répresseur I κ B (Hwang et al., 2008). De plus, nous avons vu auparavant que la stimulation des β_2 -AR était associée à une augmentation de la voie AMPc/PKA dans les cellules non neuronales, ce qui avait pour conséquence l'inhibition de la voie NF κ B, donc de la libération de cytokines pro-inflammatoires. Par contre dans le compartiment neuronal, si l'effet antiallodynique est associé à une diminution des taux d'AMPc, notamment par l'activation des DOR, l'activation de la voie NF κ B a été associée à la survie neuronale (Kaltschmidt and Kaltschmidt, 2009). Par exemple, l'activation de NF κ B protège les neurones de la toxicité des peptides amyloïdes sécrétés lors de la maladie d'Alzheimer (Barger et al., 1995), ou d'un stress excitotoxique lors d'ischémie (Goodman et al., 1996; Won et al., 2002). Dans le ganglion rachidien, le recrutement de la voie NF κ B dans les neurones sensoriels a été observé comme une conséquence à long terme d'une lésion de

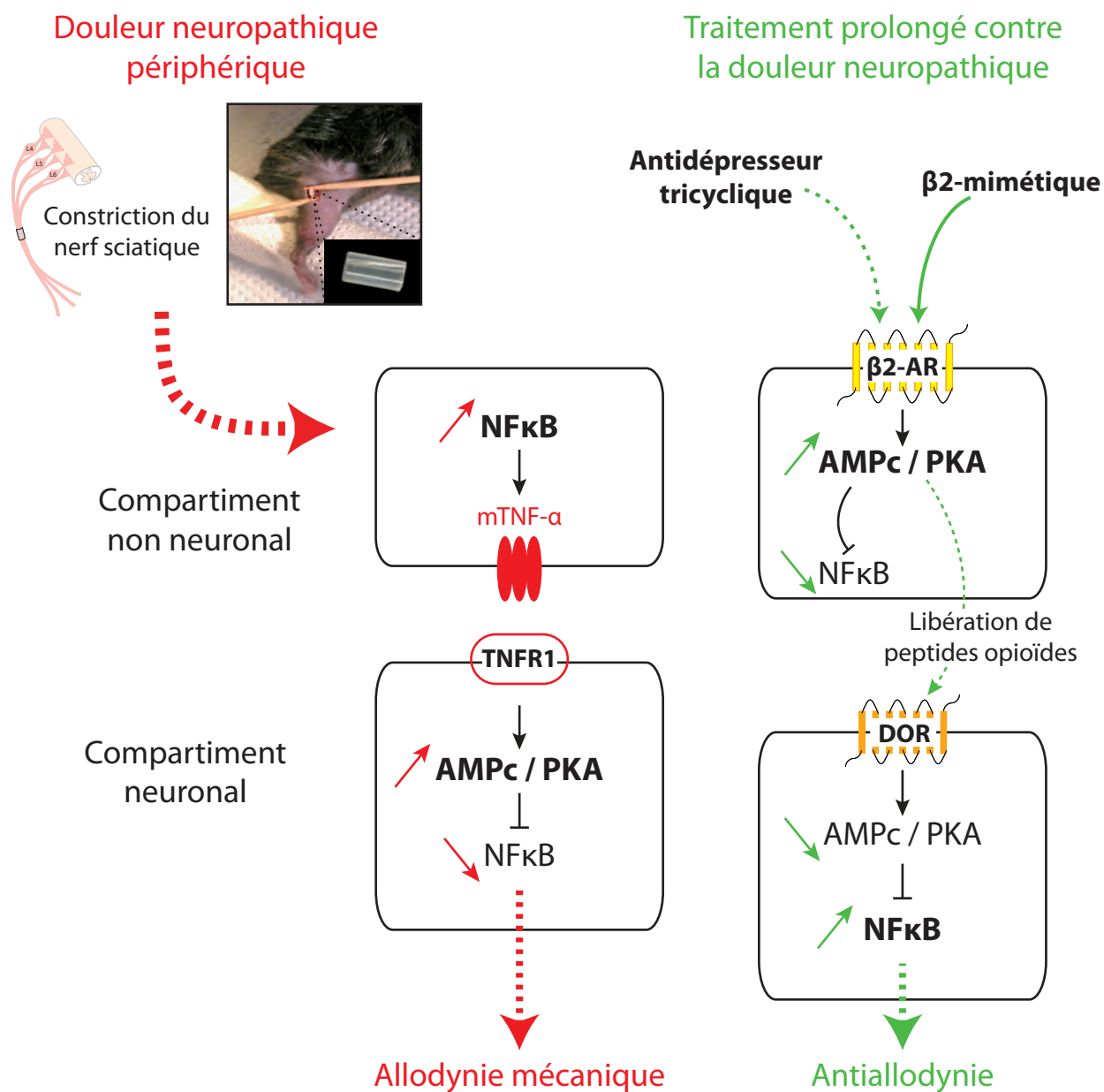


Figure D1. Représentation schématique de la notion de balance inter- et intracellulaire dans la douleur neuropathique et ses traitements.

nerf, pour les préserver des phénomènes d'apoptose (Ferryhough et al., 2005). Ainsi, on pourrait imaginer lors d'un traitement ATC une activation neuroprotectrice de NF κ B dans les neurones sensoriels du ganglion rachidien, alors que cette voie serait délétère dans les cellules non neuronales. Un argument supplémentaire à cette hypothèse pourrait être les données non publiées obtenues en mesurant l'expression génique du récepteur métabotrope du glutamate 2 (mGluR2) dans le ganglion rachidien. Il faut savoir que son expression neuronale est sous influence de l'activation de NF κ B (Chiechio et al., 2006b). Nous avons ainsi observé une diminution de l'expression de mGluR2 en condition neuropathique, reflétant vraisemblablement une diminution de NF κ B neuronal. Avec un traitement ATC, nous avons mesuré un retour à la normale de l'expression de mGluR2 donc un recrutement de NF κ B neuronal. En accord avec ces données, une étude montre que la stimulation de NF κ B par le L-acétylcarnithine conduit à une augmentation de l'expression de mGluR2 par les neurones sensoriels, ceci menant à un soulagement de la douleur neuropathique (Chiechio et al., 2006a).

Finalement, en considérant uniquement les compartiments neuronal et non neuronal, nous pourrions résumer ce concept de balance inter- et intracellulaire en fonction de la situation neuropathique ou traitée par la **figure D1**.

Suite à une lésion nerveuse périphérique, une augmentation de NF κ B dans le compartiment non neuronal conduit à une augmentation de l'expression de TNF- α qui par l'intermédiaire du TNFR1 produit en aval un recrutement de la voie AMPc/PKA dans les neurones sensoriels. Tout ceci mène à un phénomène d'allodynie.

Avec l'instauration d'un traitement prolongé par un ATC ou un β_2 -mimétique, la stimulation des β_2 -AR provoque une augmentation des taux d'AMPc dans le compartiment non neuronal, conduisant à une augmentation de la synthèse de peptides opioïdes qui stimulent en aval les DOR des afférences primaires, ce qui a pour conséquences la diminution des taux d'AMPc neuronaux et une activation de NF κ B. Tout ceci mène également à un phénomène d'antiallodynie.

E. Délai thérapeutique

Les données cliniques ont démontré qu'un antidépresseur (ATC ou IRSN) n'avait aucune action antalgique aiguë et que le traitement par des antidépresseurs nécessite d'être prolongé pour avoir une action thérapeutique sur une neuropathie installée (Mico et al., 2006; Benbouzid et al., 2008a). De plus, le délai d'action thérapeutique observé est généralement de une à deux semaines, ce qui correspondrait à la mise en jeu de mécanismes de neuroplasticité en aval. Dans notre modèle, nous avons montré que le système nerveux sympathique était le substrat anatomique de l'action des antidépresseurs dans la douleur neuropathique, or cette arborisation se met en place durant les premiers jours, voire les premières semaines, suivant la neuropathie. Ceci pourrait peut-être expliquer les données préliminaires établissant qu'un traitement antidépresseur est inefficace s'il est instauré dès l'induction de la neuropathie.

Des études antérieures ont également montré que les β_2 -mimétiques n'ont d'action antiallodynique que lorsqu'ils étaient administrés de manière prolongée (Choucair-Jaafar et al., 2009; Yalcin et al., 2010) et que dans ce cas l'action thérapeutique était indépendante du système nerveux sympathique. De manière intéressante, nous avons constaté que les cellules exprimant le β_2 -AR d'un animal contrôle sont moins sensibles à une application de β_2 -mimétique que celles d'un animal neuropathique. Cette différence de fonctionnalité pourrait s'expliquer par les différents mécanismes de sensibilisation qui ont lieu lors d'une douleur neuropathique. Le recrutement des β_2 -AR par un traitement antidépresseur ou β_2 -mimétique ne serait efficace que si les mécanismes physiopathologiques de la douleur neuropathique ont eu lieu. Ceci pourrait être en partie supporté par d'autres résultats préliminaires qui observent un effet partiel des β_2 -mimétiques si le traitement débute au moment de l'induction de la neuropathie. De plus, nous avons montré, à la fois pour les antidépresseurs (Benbouzid et al., 2008a; Benbouzid et al., 2008b) et les β_2 -mimétiques (Yalcin et al., 2010), que dans leur action antiallodynique, ils recrutaient en aval le système opioïdergique et plus particulièrement les récepteurs DOR comme effecteur thérapeutique. Finalement le délai d'action pourrait correspondre au temps mis par le β_2 -AR à recruter les DOR notamment via la synthèse éventuelle de peptides opioïdes. Ce délai de douze jours correspondrait peut-être au temps nécessaire pour accumuler assez de peptides opioïdes pour inverser la balance en faveur d'un effet antiallodynique.

Par comparaison à d'autres pathologies comme les bronchites pulmonaires chroniques obstructives, où dans la majorité des cas un traitement au long cours par un β_2 -mimétique est

recommandé, il est observé, en plus de leur action bronchodilatatrice immédiate, que les β_2 -mimétiques possèdent des propriétés anti-inflammatoires et protectrices à long terme (Johnson and Rennard, 2001). Dans ce travail, nous avons également mis en évidence que la voie NF κ B est impliquée dans le maintien de la douleur neuropathique. Cette voie de signalisation est largement décrite comme un voie de synthèse importante des cytokines pro-inflammatoires (Bowie and O'Neill, 2000). Ainsi, nous avons pu observer qu'un inhibiteur de cette cascade de transduction, le PDTC, soulageait l'allodynie neuropathique au bout d'une à deux semaines de traitement, tout comme les antidépresseurs ou les β_2 -mimétiques. Dans un modèle d'inflammation chronique, une administration prolongée de PDTC de deux semaines est également nécessaire pour obtenir un effet thérapeutique (Cuzzocrea et al., 2002). Ensuite, nous avons démontré que le TNF- α , issu de l'activation de la voie NF κ B, est un élément important du maintien de la douleur neuropathique, puisque sa seule inhibition par l'etanercept est suffisante pour obtenir un effet antiallodynique. Encore une fois, ce traitement nécessite une administration prolongée et un effet significatif était visible après douze jours. Par comparaison avec d'autres études, une administration répétée sur plusieurs jours semble nécessaire à l'obtention d'un effet thérapeutique sur une neuropathie installée (Sommer et al., 2001). Cependant, l'etanercept peut aussi fournir un effet antiallodynique s'il est administré en prophylaxie (Schafers et al., 2003) ou en périopératoire (Marchand et al., 2009). Son action passerait donc par une inhibition de la cascade inflammatoire consécutive à la lésion nerveuse puisque le TNF- α est aussi un élément important dans l'initiation de la réaction inflammatoire (Witkamp and Monshouwer, 2000). Dans d'autres pathologies comme l'asthme sévère, des études cliniques ont montré que le TNF- α pouvait également jouer un rôle important (Berry et al., 2006) et que le traitement prolongé de plusieurs semaines par l'etanercept pouvait avoir un bénéfice thérapeutique chez les patients asthmatiques (Berry et al., 2006; Brightling et al., 2008). Dans notre étude, nous pouvions penser qu'en inhibant la synthèse ou l'action directe du TNF- α , un effecteur important de la pathologie, nous aurions pu diminuer le délai thérapeutique. Dans le cas de traitements par les antidépresseurs ou les β_2 -mimétiques, nous avons avancé l'argument qu'un recrutement du système opioïdérique secondaire pouvait être une explication du délai thérapeutique. Toutefois, il semblerait que le lien entre TNF- α et système opioïdérique ne soit pas aussi direct que celui entre β_2 -AR et ce système.

Dans une douleur neuropathique, peu importe le niveau d'intervention dans le ganglion rachidien, le délai d'action thérapeutique semble peu modulable. Ainsi, le délai thérapeutique pourrait correspondre aux modifications en cascade apportées dans d'autres structures du système nociceptif notamment centrales. Même si les modifications moléculaires ou

cellulaires de l'effet du traitement sont déjà présentes au bout de quelques jours dans le ganglion rachidien, le délai correspondrait alors au temps mis par le système nerveux central à inverser les changements opérés par la pathologie. Un exemple clinique supporte cette idée de réorganisation centrale suite à une administration prolongée. Le patient neuropathique suite à l'administration intraveineuse de lidocaïne voit ses symptômes douloureux diminués et ceci est associé à des changements d'activité thalamique (Cahana et al., 2004). Même si la lidocaïne peut directement agir en inhibant la transmission nerveuse, on voit que son efficacité à long terme dans la douleur neuropathique repose sur une administration prolongée. Ainsi, les traitements pharmacologiques dans la plupart des cas possèdent un délai thérapeutique d'action variable, de quelques jours à quelques semaines. D'autre part, de récents travaux observent qu'une lésion du cortex insulaire chez l'animal abolit tout phénomène d'allodynie (Coffeen et al., 2011). Dans certaines douleurs neuropathiques réfractaires à tout traitement pharmacologique, des approches plus directes et non pharmacologiques de certaines structures centrales ont été utilisées. En clinique, les techniques neuroablatives comme la cordotomie ont révélées un effet thérapeutique immédiat associé à une diminution de l'hyperexcitabilité thalamique dans certains cas de douleur chronique (Di Piero et al., 1991). Des techniques moins invasives de neurostimulation thalamique ou corticale se sont révélées tout aussi efficaces avec un effet quasi immédiat (de quelques heures) et durable (Katayama et al., 1986; Peyron et al., 1995; Rezai et al., 1999; Davis et al., 2000; Cruccu et al., 2007).

Le délai thérapeutique pourrait ainsi correspondre à la mise en jeu de phénomènes de plasticité, impliquant des mécanismes en cascade allant de la périphérie à la moelle épinière puis au niveau supraspinal.

PERSPECTIVES

Dans l'étude du mécanisme d'action des antidépresseurs dans un modèle murin de douleur neuropathique, nous avons recherché à localiser l'action thérapeutique et à mettre en évidence le mécanisme moléculaire par lequel ils exerçaient leur effet thérapeutique contre la douleur neuropathique. Par ailleurs, nous avons étudié l'implication des récepteurs opioïdes dans l'effet antiallodynique des antidépresseurs et des β_2 -mimétiques.

A propos de la localisation de l'effet thérapeutique des antidépresseurs et des β_2 -mimétiques, nous concluons que cet effet antalgique a lieu principalement en périphérie, et plus particulièrement dans les ganglions rachidiens. Nous avons également observé que les β_2 -AR étaient portés par les cellules gliales, suggérant une communication neuro-gliale privilégiée, entre le β_2 -AR présent sur la cellule satellite gliale et le DOR potentiellement sur les neurones des ganglions rachidiens.

Concernant le mécanisme physiopathologique sous-jacent, nous avons vu que l'augmentation de l'expression du TNF- α dans les ganglions rachidiens jouait un rôle essentiel dans le maintien de la douleur neuropathique. L'inhibition de l'action du TNF- α , soit directement par l'etanercept, soit indirectement par un antidépresseur ou un β_2 -mimétique, est primordiale pour obtenir un effet antiallodynique dans notre modèle de douleur neuropathique.

Nous connaissons l'implication des composantes noradrénergique et opioïdergique avec respectivement les β_2 -AR et les DOR. Nous avons démontré que l'action antiallodynique des antidépresseurs et des β_2 -mimétiques ne nécessitent ni les MOR ni les KOR.

Lors de ces travaux nous avons mis l'accent sur le fait qu'à l'intérieur du ganglion rachidien différents types cellulaires existaient, notamment neuronaux et non neuronaux. A terme, les expériences devront tenir compte de cette imbrication pour étudier la répartition cellulaire et les liens moléculaires entre les trois acteurs (β_2 -AR, TNF- α et DOR). Ainsi, nous pourrions déterminer si la stimulation du β_2 -AR contrôle directement, c'est-à-dire dans la même cellule, ou indirectement la synthèse de TNF- α . Nous savons également que le DOR est indispensable à l'effet thérapeutique d'un antidépresseur ou d'un β_2 -mimétique. La question suivante est de savoir si le β_2 -AR recrute en aval le DOR afin d'inhiber l'expression du TNF- α . En d'autres termes, le DOR est-il au centre du mécanisme thérapeutique des antidépresseurs ou des β_2 -mimétiques, ou est-ce un mécanisme parallèle à la relation β_2 -AR / TNF- α . De plus, pour vérifier notre hypothèse proposant le ganglion rachidien comme lieu d'action primaire des antidépresseurs, la suite des travaux seraient d'étendre à d'autres modèles traumatiques périphériques ou d'infection par le VIH.

ANNEXES

Au sein de l'équipe, parallèlement à mes travaux de doctorat, j'ai pu collaborer avec le Dr Yalcin dont les recherches s'intéressent aux conséquences émotionnelles de la douleur neuropathique.

En clinique, la douleur chronique est souvent associée aux développements de troubles affectifs. Cependant, les recherches précliniques à ce sujet sont contrastées et l'interrelation entre douleur chronique et trouble de l'humeur reste peu claire. Dans cette étude, nous avons caractérisé les conséquences affectives de la douleur neuropathique en fonction du temps et nous avons étudié les mécanismes potentiellement impliqués.

Dans notre modèle de douleur neuropathique du « cuff », les souris développent des comportements d'anxiété quatre semaines après l'induction de la neuropathie, alors que les comportements de type dépressifs n'apparaissent qu'après six à huit semaines. Les souris contrôles et neuropathiques n'ont pas de différence dans les taux de corticostéroïdes circulants en condition basale ou stressée, suggérant ainsi qu'il n'y ait pas de modifications de fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Après huit semaines, une diminution de l'activité du facteur de transcription CREB est observée dans la couche granulaire externe du gyrus denté chez des souris neuropathiques, mais pas dans d'autres structures limbiques comme l'amygdale ou le cortex antérieur cingulaire.

Ces résultats démontrent que les conséquences affectives de la douleur neuropathique évoluent avec le temps, indépendamment de l'axe hypothalamo-hypophysaire dont l'activité reste inchangée. A des temps tardifs de la neuropathie, l'activité de CREB est altérée dans certaines structures du système limbique. Ces données fournissent ainsi un modèle préclinique pertinent dans l'étude du développement des troubles de l'humeur lors de douleur neuropathique.

ARCHIVAL REPORT

A Time-Dependent History of Mood Disorders in a Murine Model of Neuropathic Pain

Ipek Yalcin, Yohann Bohren, Elisabeth Waltisperger, Dominique Sage-Ciocca, Jerry C. Yin, Marie-José Freund-Mercier, and Michel Barrot

Background: Chronic pain is clinically associated with the development of affective disorders. However, studies in animal models of neuropathic pain are contradictory and the relationship with mood disorders remains unclear. In this study, we aimed to characterize the affective consequences of neuropathic pain over time and to study potential underlying mechanisms.

Methods: Neuropathic pain was induced by inserting a polyethylene cuff around the main branch of the right sciatic nerve in C57BL/6J mice. Anxiety- and depression-related behaviors were assessed over 2 months, using a battery of tests, such as elevated plus maze, marble burying, novelty suppressed feeding, splash test, and forced swimming test. Plasma corticosterone levels were assessed by radioimmunoassay. We also investigated changes in cyclic adenosine monophosphate response element (CRE) activity using CRE-LacZ transgenic mice.

Results: Mice developed anxiety-related behavior 4 weeks after induction of the neuropathy, and depression-related behaviors were observed after 6 to 8 weeks. Control and neuropathic mice did not differ for basal or stress-induced levels of corticosterone or for hypothalamic-pituitary-adrenal axis negative feedback. After 8 weeks, the CRE-mediated activity decreased in the outer granule layer of dentate gyrus of neuropathic mice but not in the amygdala or in the anterior cingulate cortex.

Conclusions: Our results demonstrate that the affective consequences of neuropathic pain evolve over time, independently from the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, which remains unaffected. CRE-mediated transcription within a limbic structure was altered at later time points of the neuropathy. These experiments provide a preclinical model to study time-dependent development of mood disorders and the underlying mechanism in a neuropathic pain context.

Key Words: Anxiety, CREB, corticosterone, depression, hippocampus, neuropathic pain

Mood disorders such as depression and anxiety are frequently observed in patients suffering from chronic pain. Epidemiologic studies reported approximately 50% mean prevalence rate for major depressive disorder in these patients (1,2). This prevalence was of 34% for patients suffering from neuropathic pain which is a pain consecutive to a lesion or disease affecting the somatosensory system (3). Although this comorbidity is clinically well established, the underlying mechanisms remained unclear. To date, animal studies investigating the relationships between neuropathic pain and mood disorders are limited and contradictory. Indeed, initial studies failed to show any association between neuropathic pain and anxiety- and depression-related behaviors (4,5), whereas other research groups observed anxiety and/or depression related phenotypes (6–8). However, the first studies were done during the first 3 weeks following neuropathy induction, and the others were done at later time points. This suggests that the time factor may be critical to model the affective consequences of neuropathic pain. Our first aim was thus to characterize the affective consequences of neuropathic pain over time, using a battery of behavioral tests.

Mood disorders have often been associated with disturbances of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. Indeed, hyperactivity

and negative feedback impairment of the HPA axis have been clinically and preclinically associated with depressive episodes (9–11). Such alterations in the HPA axis may, for example, result from long-term stress exposure (12). Because painful situations could be considered as a potential stress for the organism, our second aim was to test whether mice with chronic neuropathic pain may display altered basal or stress-induced corticosterone levels or negative feedback impairment of the HPA axis.

Alterations of intracellular pathways linked to neuroplasticity have also been associated with mood disorders (13,14). Among these alterations, changes in the activity of the transcription factor cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element (CRE)-binding protein (CREB) within the limbic system were proposed to participate to antidepressant drug action (15–17) and to depression-like phenotypes (18,19). The third aim of our study was to assess changes in CRE-mediated activity in the dentate gyrus, the central and basolateral nucleus of amygdala (CeA and BLA), and the anterior cingulate cortex (ACC), using CRE-LacZ reporter mice.

In the present work, we used a sciatic nerve constriction model of chronic neuropathic pain (20–23) to assess time-dependent changes potentially reflecting mood disorders. Our results revealed a history of anxiety and depression-related phenotypes over 2 months following the induction of the neuropathy. Interestingly, the results demonstrate that the affective consequences of neuropathic pain are independent from HPA axis dysregulation. On the contrary, alterations of CRE-mediated transcription developed with long-term neuropathy in the outer granule layer of dentate gyrus. These experiments provide a preclinical model for the study of time-dependent development of mood disorders and their underlying mechanism in a neuropathic pain context.

Methods and Materials

Animals and Neuropathy Model

Behavioral experiments ($N = 100$) and corticosterone level measurements ($N = 120$) were conducted in male C57BL/6J mice

From the Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique (IY, EW, MB); Université de Strasbourg (YB, M-JF-M), and Chronobiotron, Centre National de la Recherche Scientifique (DS-C), Strasbourg, France; and Department of Genetics (JCY), University of Wisconsin, Madison, Wisconsin.

Address correspondence to Michel Barrot, Ph.D., Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, 21 rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France; E-mail: mbarrot@inci-cnrs.unistra.fr.

Received Feb 17, 2011; revised Jun 22, 2011; accepted Jul 18, 2011.

(Charles River, L'Arbresle, France). CRE-related activity was assessed by using CRE-LacZ mice ($N = 18$), wherein β -galactosidase (β -gal) was expressed under the control of seven CRE consensus sequences in tandem upstream of a minimal somatostatin promoter (24–26; see also Supplement 1).

Neuropathic pain was induced by placing a cuff around the right common sciatic nerve (20–23). Surgery was done under ketamine (17 mg/mL) and xylazine (2.5 mg/mL) anesthesia (intraperitoneal, 4 mL/kg). The common branch of the right sciatic nerve was exposed, and a 2-mm section of split PE-20 polyethylene tubing (Harvard Apparatus, Les Ulis, France) was placed around it for the cuff group (21–23). Sham-operated mice underwent the same procedure without cuff implantation (sham group).

The mechanical threshold of hind-paw withdrawal was evaluated using von Frey hairs (Bioseb, Chaville, France) (23,27). Mice were placed in clear Plexiglas boxes ($7 \times 9 \times 7$ cm) on an elevated mesh screen. They were allowed to habituate for 15 min before testing. Filaments were applied to the plantar surface of each hind paw in a series of ascending forces (.4 to 10 g). Each filament was tested five times per paw, being applied until it just bent, and the threshold was defined as three or more withdrawals observed out of the five trials.

Locomotor Activity

To monitor locomotor activity, mice were individually placed in activity cages (32×20 cm floor area, 15 cm high) with seven photocell beams. The number of beam breaks was recorded over 4 h.

Behavioral Overview

Behavioral testing was performed during the dark phase, under red light. Although each mouse went through different tests, they were conducted according to the following rules: 1) at least 1 week separated two tests done on the same animal; 2) no mouse went twice through the same test (i.e., the different time points for a given test were done on independent sets of animals); 3) the forced swim test was always considered as terminal (i.e., no other test was done on mice after they went through forced swimming).

Light–Dark Test

The apparatus consisted of light and dark boxes ($18 \times 18 \times 14.5$ cm each) connected by a dark tunnel ($8.5 \times 7 \times 6$ cm). The lit compartment was brightly illuminated (1500 lux). Mice were placed in the dark compartment in the beginning of the test and the time spent in the lit compartment was recorded during 5 min (28).

Marble Burying Test

This test was done in Plexiglas cages ($27 \times 16 \times 14$ cm) containing 3 cm of fine sawdust. Twenty-five glass marbles (1 cm diameter) were evenly spaced on top of the sawdust. Mice were placed individually into the cages and left undisturbed for 30 min, following which they were removed, and an observer blind to the condition of the animals counted the buried marbles. Marbles were considered buried if two thirds or more of their surface was covered by sawdust. The number of buried marbles is considered a measure of animal anxiety (22,29,30).

Novelty Suppressed Feeding Test

The testing apparatus consisted of a $40 \times 40 \times 30$ cm plastic box with the floor covered with 2 cm of sawdust. Twenty-four hours before the test, food was removed from the home cage. At the time of testing, a single pellet of food was placed on a paper in the center of the box. An animal was then placed in a corner of the box and latency to first contact or to eat the pellet were recorded within a

5-min period. This test induces a conflict between the drive to eat the pellet and the fear of venturing in the center of the box (31).

Splash Test

This test, based on grooming behavior, was performed as previously described (31,32). The frequency and latency of the grooming behavior were scored during 5 min after spraying a 10% sucrose solution on the dorsal coat of the mice.

Forced Swim Test

Forced swim test (FST) (33) was done by gently lowering the mouse into a glass cylinder (height 17.5 cm, diameter 12.5 cm) containing 11.5 cm of water (23° – 25° C). Test duration was 6 min. The mouse was considered immobile when it floated in an upright position and made only small movements to keep its head above water. Because little immobility was observed during the first 2 min, the duration of immobility was quantified over the last 4 min of the 6-min test.

HPA Axis Parameters

To avoid possible influence of behavioral tests on corticosterone measurement, blood was collected from separate sets of animals, independent from the behavioral ones. In less than 3 min after mouse removal from the home cage, tail blood samples were collected to assess baseline corticosterone levels. Mice were then placed in a restrainer (2.6 cm diameter, 10 cm long) for 20 min, and a second blood sample was taken. In an independent experiment, the procedure was reproduced, the mice were put back in their home cage after the 20 min restrain stress, and a last sampling was done to assess the negative feedback of corticosterone by collecting trunk blood 80 min after the start of the stress. To minimize circadian effects on corticosterone levels, blood was collected during the light phase, 3 to 6 hours after lights went on. Blood was centrifuged (2100 g for 15 min at 4° C) and plasma samples were stored at -20° C until assay. Plasma corticosterone levels were measured using a commercial 125 I radioimmunoassay kit for mice and rats (MP Biomedicals, Illkirch, France). The lower sensitivity limit was .6 ng/mL. Inter- and intraassay coefficients of variation averaged $<10\%$. In independent sets of animals and as an indirect measure of HPA axis function, pituitary and adrenal glands were removed and their wet weights immediately measured at 2, 4, and 8 weeks after induction of the neuropathy.

Immunohistochemistry and Analysis

CRE-LacZ mice were perfused 2 or 8 weeks after cuff implantation under deep chloral hydrate anesthesia (40%, Sigma, St. Louis, Missouri) with 10 mL phosphate buffer (.1 M, pH 7.4) followed by 100 mL of a paraformaldehyde solution (4% in phosphate buffer). Brains were removed and postfixed overnight in the same fixative. Frontal sectioning of the brain (40 μ m) was performed on a vibratome (Leica, Rueil-Malmaison, France). β -gal immunostaining was done according to standard procedures (Supplement 1).

Coded slides were used to analyze the number of β -gal positive nuclei. Blind counting was done using a Nikon Eclipse 80i microscope with the Neurolucida 8.0 software (MicroBrightField, Williston, Vermont). We counted the number of β -gal-positive nuclei bilaterally in the granular layer of dentate gyrus between -1.34 and -2.14 mm from the bregma, in the CeA and BLA between -1.06 and -1.7 mm from the bregma, and in the ACC between 1.34 and 0.38 mm from the bregma, by analyzing a 40- μ m section every 160 μ m. Pictures were taken by using Nikon E80i microscope. Adobe Photoshop (Adobe, San José, California) was used to adjust contrast, brightness and sharpness.

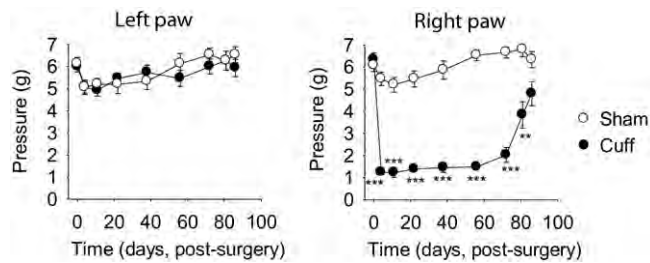


Figure 1. Cuff implantation induced long-lasting mechanical allodynia in C57BL/6J mice. Cuff mice developed an ipsilateral mechanical allodynia lasting over 3 months. The right hind-paw surgical procedure did not affect left hind-paw withdrawal thresholds. Data are expressed as mean $\pm$ SEM (cuff group, $n = 10$ –12; sham group, $n = 10$ –12). $^{**}p < .001$, $^{***}p < .0001$ sham vs. cuff.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis were performed with STATISTICA 7.1 (Statsoft, Tulsa, Oklahoma) using multifactor analysis of variance with independent or repeated measures or unpaired *t* tests in accordance with the experimental design. In case of significant effect following analysis of variance, multiple group comparisons were done with Duncan post hoc analysis. Significance level was set at $p < .05$.

Results

Neuropathic Allodynia and Locomotor Activity

We induced sciatic nerve injury using the cuff model. Although there was no difference in the mechanical threshold between groups before surgery, unilateral cuff implantation produced an ipsilateral mechanical allodynia lasting 3 months [Figure 1; $F(8,24) = 15.798$, $p < .00001$]. It is worth mentioning that each of the cuff mice (and none of the sham mice) developed unilateral neuropathic allodynia (see, for example, Figure S2A in Supplement 1). We

then evaluated the spontaneous locomotor activity to control whether behavioral phenotypes were independent from possible activity deficits. We observed no difference between sham and cuff mice for their locomotor activity at 4, 5, and 7 weeks after surgery [Table S1 in Supplement 1; Time effect, $F(2,54) = .119$, $p > .88$; Group effect, $F(1,54) = .017$, $p > .89$].

Anxiety-Like Phenotypes

We used light–dark and marble burying tests to assess anxiety-like phenotypes in neuropathic mice at different postoperative (PO) time points. In the light–dark test, neuropathic pain increased anxiety-like behavior as shown by the reduced time spent in the lit compartment at 4, 7, and 8 weeks PO in cuff mice compared with sham mice (Figure 2A, $p < .05$, $p < .0001$, $p < .0001$, respectively). At 2 weeks PO, cuff mice spent less time in the lit compartment, but this difference was not statistically significant ($p = .07$). In marble burying test, sham and cuff mice did not differ for the number of buried marbles at 2 weeks PO, whereas neuropathic mice buried significantly more marbles at 4 and 6 weeks PO (Figure 2B, $p > .4$, $p < .01$, $p < .01$, respectively), demonstrating anxiety-like phenotype.

Novelty Suppressed Feeding Test

Novelty suppressed feeding (NSF) testing reveals both anxiety and depression-like phenotypes (31,34). In this test, neuropathic mice displayed increased latency to first contact with the food pellet (Figure S1A in Supplement 1, $p > .52$ [4 weeks PO], $p < .0001$ [5 weeks PO], $p < .0001$ [8 weeks PO]) and first bite (Figure 2C, $p < .05$, $p < .0001$) at 5 and 8 weeks PO but not at 4 weeks ($p = .83$).

Depression-Like Phenotypes

Depression-like phenotype was assessed using the splash test and the FST. The splash test allows measurement of grooming behavior. This index of hygiene has been reported to be affected in murine models of mood disorders, such as the chronic mild stress, and to be corrected by chronic antidepressant treatment (32,34). In

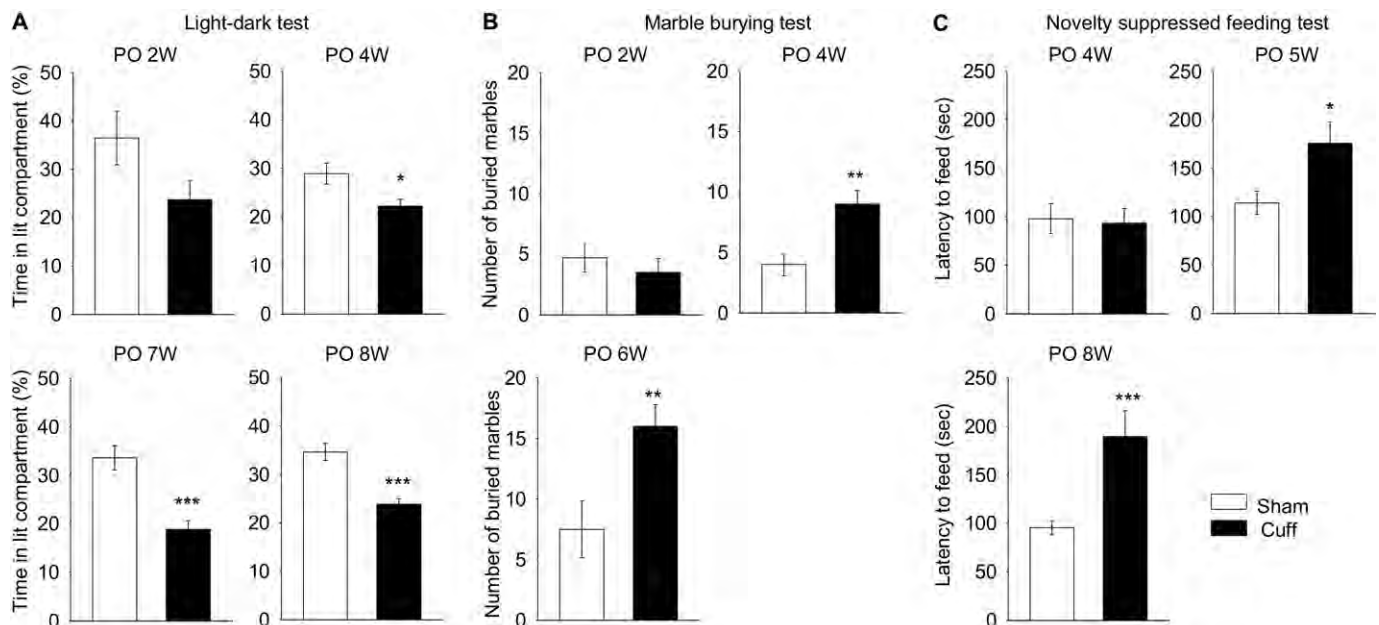


Figure 2. Neuropathic mice developed an anxiety-like phenotype in a time-dependent manner. (A) Cuff implantation significantly decreased the time spent in the lit compartment of the light–dark box at 4, 7, and 8 weeks (W) postoperative (PO). (B) Cuff mice buried more marbles than sham mice in the marble burying test at PO 4W and 6W. (C) The latency to feed was increased in cuff mice in the novelty suppressed feeding test at 5 and 8 weeks PO. Data are expressed as mean $\pm$ SEM (cuff groups, $n = 10$ –12 per time point; sham groups, $n = 10$ –12 per time point). $^{*}p < .05$, $^{**}p < .01$, $^{***}p < .001$ sham vs. cuff.

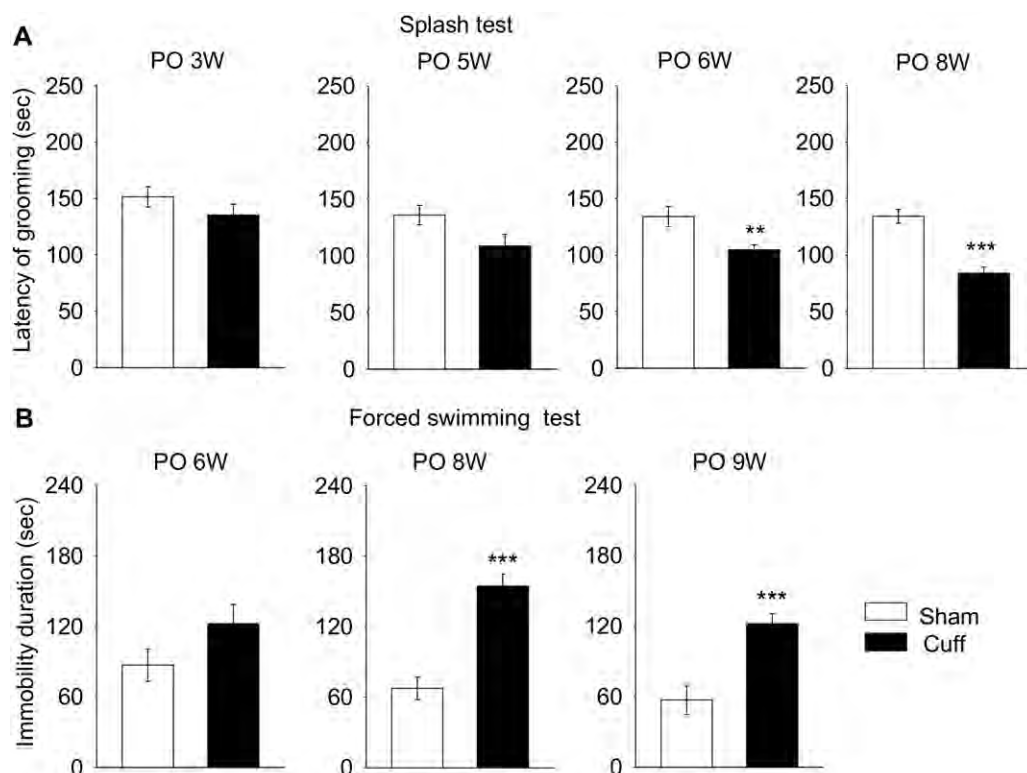


Figure 3. Neuropathic mice developed a depression-like phenotype in a time-dependent manner. **(A)** Cuff implantation decreased the latency of grooming behavior in the splash test at postoperative (PO) weeks (W) 6 and 8. **(B)** The immobility time increased in cuff mice in the forced swimming test at PO 8W and 9W. Data are expressed as mean $\pm$ SEM (cuff groups, $n = 10-12$ per time point, sham groups, $n = 10-12$ per time point). ** $p < .01$, *** $p < .001$ sham vs. cuff.

the present chronic pain model, no difference between sham and cuff mice was present at 3 and 5 weeks PO for the grooming latency (Figure 3A, $p = .23$, $p = .056$). On the contrary, neuropathic mice displayed a grooming latency deficit at 6 and 8 weeks PO (Figure 3A, $p < .01$, $p < .001$). Another parameter given by the test, the grooming frequency, was decreased at 5 and 8 weeks PO (Figure S1B in Supplement 1, $p < .05$, $p < .0001$). FST is frequently used for phenotypic screening of depression-related behaviors in mice (35). Increased immobility in neuropathic mice was observed at 8 and 9 weeks PO but not at earlier time points (Figure 3B, $p < .0001$, $p < .001$).

Figure 4 summarizes the tests and results that we obtained. It shows that neuropathic mice develop anxiety and depression-like behaviors in a time-dependent manner.

HPA Axis Activity

The HPA axis can play a key role in the pathogenesis of mood disorders (9–11). To determine whether the affective consequences of neuropathic pain may be related to changes in HPA axis activity, we measured plasma corticosterone concentrations at baseline and following a 20-min restraint stress. There was no difference between sham and cuff mice for either baseline or stress-induced plasma corticosterone concentrations at 2, 4, and 8 weeks PO [Figure S2C and S2D in Supplement 1; Time effect, $F(1,17) = 1022$, $p < .0001$; Group effect, $F(1,17) = .052$, $p > .82$ for 2 weeks; Time effect $F(1,16) = 404.75$, $p < .0001$; Group effect, $F(1,16) = .113$, $p > .74$ for 4 weeks; Time effect, $F(1,17) = 348.48$, $p < .0001$; Group effect, $F(1,17) = .17$, $p > .68$ for 8 weeks]. Because negative feedback impairment of the HPA axis may also participate to the development of mood disorders (36), we reproduced the previous experiment in an independent set of animals, adding a third sampling

point at 80 min after the end of the stress procedure. As observed in the first experiment, the baseline and stress-induced plasma corticosterone levels did not differ between sham and cuff mice [Figure 5 and Figure S2B in Supplement 1; Time effect $F(2,26) = 381.93$, $p < .0001$; Group effect, $F(2,26) = .29$, $p > .74$ for 2 weeks; Time effect, $F(2,22) = 337.886$, $p < .0001$; Group effect, $F(2,22) = .439$, $p > .64$ for 4 weeks; Time effect, $F(2,28) = 164.94$, $p < .0001$; Group effect, $F(2,28) = 1.25$, $p > .3$ for 8 weeks]. Similarly, no difference was

Time (weeks) →					
	2-3w	4-5w	6-7w	8-9w	
Activity	0	0	0	0	
FST/TST ⁽¹⁾	0 ⁽¹⁾	0 ⁽¹⁾	0	+	Depression-like
Splash	0	0	+	+	
NSF		0/+	+	+	
Marble burying	0	+	+	+	Anxiety-like
Light - dark	0	+	+	+	

Figure 4. Affective consequences of neuropathic pain. This figure summarizes the tests used and the results obtained in this study. 0, no phenotype; +, anxiety- or depression-like phenotype depending on tests used. FST, forced swim test; NSF, novelty suppressed feeding; TST, tail suspension test. ¹TST was performed in a previous study (22).

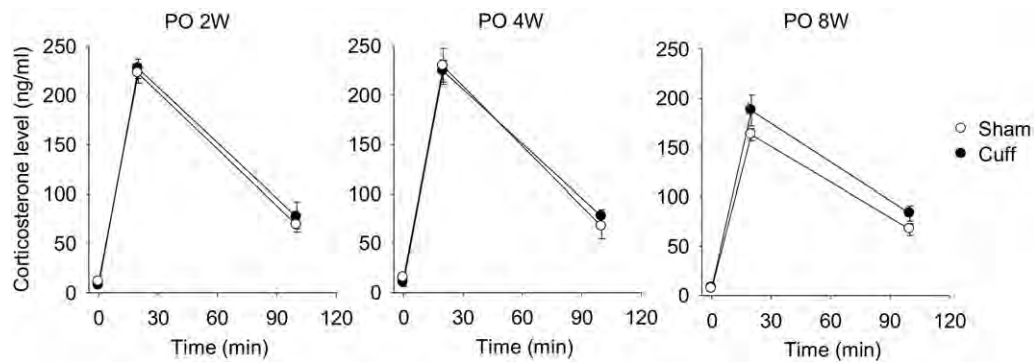


Figure 5. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity was not altered in neuropathic mice. No difference was observed between sham and cuff mice for either baseline or stress-induced plasma corticosterone concentrations at postoperative (PO) weeks (W) 2, 4, and 8. To test for negative feedback impairment of hypothalamic-pituitary-adrenal axis, the plasma corticosterone level was also measured 80 min after the stress; no difference was observed between sham and cuff mice for this parameter. Data are expressed as mean $\pm$ SEM (cuff groups, $n = 10$ per PO time point, sham groups, $n = 10$ per PO time point).

observed at the 80-min time points, suggesting that HPA axis feedback is not significantly altered in neuropathic mice.

As another index of potential HPA axis dysfunction, we also measured the pituitary and the adrenal glands weights, but we observed no influence of the neuropathy at 2, 4, or 8 weeks PO (Table 1; $p > .87$, $p > .09$, $p > .17$ for pituitary and $p > .09$, $p > .54$, $p > .91$ for adrenal glands, respectively).

CRE-Mediated Activity

Changes in the activity of the transcription factor CREB have been related to adaptive processes associated with depression and depression treatment (15,19). To assess possible changes in limbic CREB activity with neuropathic pain, we studied CRE-LacZ mice at 2 and 8 weeks PO. Cuff mice showed a decreased number of β -gal-positive cells within the dentate gyrus at 8 weeks, but not at 2 weeks, PO [Figure 6; $F(5,40) = .67$, $p > .64$ for 2 weeks; $F(5,30) = 3.26$, $p < .01$ for 8 weeks]. This decrease more specifically concerned the outer portion of the granule cell layer. Those are mature, embryonic-generated granule cells, in contrast to the inner granule cell layer, which in general is postnatal and adult-generated (37,38).

In contrast, we could not detect changes in CRE-mediated activity within the CeA [Figure S3A in Supplement 1; $F(4,32) = .34$, $p > .84$ for 2 weeks; $F(4,24) = .52$, $p > .71$ for 8 weeks] and BLA [Figure S3A in Supplement 1; $F(4,32) = 1.32$, $p > .28$ for 2 weeks; $F(4,24) = .18$, $p > .94$ for 8 weeks] after 2 and 8 weeks of cuff implantation, or in the ACC at 8 weeks PO [Figure S3B in Supplement 1; $F(4,24) = .18$, $p > .94$ for 8 weeks].

Table 1. Adrenal and Pituitary Gland Weights Were Not Altered in Neuropathic Mice

	Adrenal Gland	Pituitary Gland
PO 2 Weeks		
Sham	4.86 $\pm$.34	1.24 $\pm$.04
Cuff	4.05 $\pm$.24	1.22 $\pm$.10
PO 4 Weeks		
Sham	4.35 $\pm$.22	1.06 $\pm$.07
Cuff	4.60 $\pm$.32	1.26 $\pm$.07
PO 8 Weeks		
Sham	4.81 $\pm$.21	1.23 $\pm$.05
Cuff	4.78 $\pm$.25	1.37 $\pm$.08

No difference was observed between sham and cuff mice at postoperative (PO) weeks 2, 4, and 8. Data are expressed as mean $\pm$ SEM (cuff groups, $n = 5-6$ per time point, sham groups, $n = 5-6$ per time point).

Discussion

Our results show that neuropathic pain induced anxiety and depression-related behaviors in a time-dependent manner. Indeed, neuropathic mice developed anxiety-related behavior 4 weeks after the surgery, whereas depression-related behavior was only observed after 6 weeks following the induction of neuropathic pain. In addition, our results showed that the affective consequences of neuropathic pain are independent from HPA axis dysregulation. We also observed that CRE-mediated activity diminished with long-term neuropathy in the outer granule layer of dentate gyrus.

Few animal studies investigated the presence of mood disorders in neuropathic pain models. In a rat model of peripheral neuropathy, the rats displayed allodynia without modifications of affective behaviors 14 days after spinal nerve ligation (4). Similarly, neuropathic mice did not develop fear avoidance or depression-related behavior up to 28 days after partial sciatic nerve ligation (5). On the contrary, in other studies, neuropathic mice developed anxiety-related behavior at 4 (8) or 8 weeks (6) and depression-related behavior at 8 weeks after the neuropathy (6). These apparent discrepancies suggest that the time factor could be a decisive parameter when studying the affective consequences of neuropathic pain. For that reason, we used a battery of tests at different time points to characterize the development of the pathology. In our model, during the first 3 weeks, we did not observe either anxiety- or depression-related behavior, which is consistent with previous studies (4,5). However, changes in the anxiety-related behaviors, such as observed with the light-dark and marble burying tests, were present from 4 weeks on, and they were still present at 8 weeks PO. In the NSF test, which is sensitive to both anxiety- and depression-related phenotypes, a difference between neuropathic mice and control was demonstrated from 5 weeks on. In our model, depression-related phenotype appeared later than anxiety-related phenotypes. Indeed, neuropathic mice showed decreased grooming from 6 weeks PO and increased immobility in FST from 8 weeks PO. Together these results suggest that affective disturbances due to neuropathic pain evolve with time.

Although time-dependent etiology of mood disorders may sound obvious, this parameter is rarely considered in preclinical research (39-42). It is, however, of interest, because reproducing the evolution of the pathology may provide a useful model to study the underlying mechanism. The delay in the therapeutic onset of antidepressant drugs led to the notion that long-term molecular and neural plasticity may be critical to their therapeutic action, which could imply chromatin regulation and gene expression, neu-

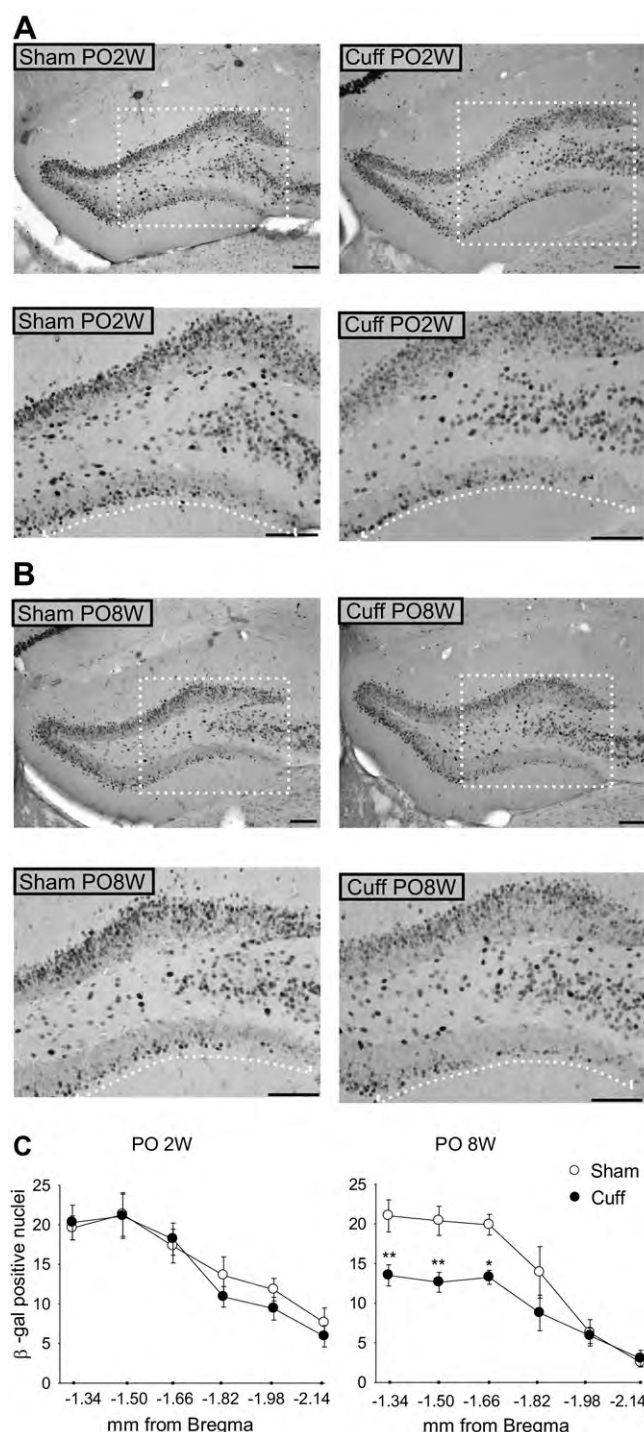


Figure 6. Cyclic adenosine monophosphate response element (CRE)-mediated activity changed in neuropathic CRE-LacZ mice in a time-dependent manner. Although no difference was observed between sham and cuff mice for CRE-mediated activity at postoperative (PO) week (W) 2 (**A**), cuff mice showed a decreased number of β -gal positive cells within the outer portion of granule layer of dentate gyrus at 8 weeks (**B**). The number of β -gal-positive nuclei bilaterally in the granular layer of dentate gyrus, between -1.34 and -2.14 mm from the bregma was counted (**C**). Scale bars = $100 \mu\text{m}$ in panels A and B. The outer portion of the granule cell layer of dentate gyrus where the counting was realized is outlined on the pictures. Data are expressed as mean $\pm$ SEM (cuff groups, $n = 4$ –5 per time point, sham groups, $n = 4$ –5 per time point). * $p < .05$, ** $p < .01$ sham vs. cuff.

retrophen recruitment, stimulation of dendritic arborization and spines, as well as neurogenesis (43,44). It is likely that not only the treatments but also the affective pathologies themselves may require similar long-term molecular and neural plasticity. In this context, models that provide a time-dependent evolution of the anxiety- or depression-related phenotypes are of interest to study mood disorder etiology. Our time-dependent description of anxiety- and depression-related phenotypes associated with neuropathic pain offers such a model, which should lead to better preclinical understanding of molecular and neural mechanisms leading to the development of these phenotypes.

There is an intimate relationship between the effects of stress and the pathophysiology of depression because chronic stress precipitates or exacerbates the depression state (45). In our model, neuropathy per se may act as a stress on the organism, and neuropathic pain could be considered a continuous form of chronic stress. If neuropathic pain acts as a chronic stress to influence affective parameters, it should result in HPA axis dysfunction. Three weeks after the induction of nerve constriction injury in rats, no alteration in plasma corticosterone and adrenocorticotrophic hormone was found at basal level and after restraint stress (46,47). However, our results suggest that affective changes require at least 4 weeks to be observed. Thus, we tested the HPA axis function over time. Our results showed that neuropathy did not alter basal or stress-induced corticosterone levels at 2, 4, and 8 weeks PO. We also controlled for the function of HPA axis negative feedback, which was not altered in neuropathic mice. Similarly, adrenal and pituitary weights were not affected. Sustained neuropathic pain thus appears different from a simple chronic stress to the animal, at least for the neuroendocrine response, even if it induces similar behavioral consequences. These preclinical findings are in agreement with clinical observations. Indeed, there is no clinical evidence for HPA axis abnormalities in neuropathic pain patients. Although neuropathic pain is not clinically associated with changes in HPA axis function, fibromyalgia, which is another type of chronic pain with a high rate of concurrent mood disorders, is generally associated with decreased cortisol production and release (10,48), similar to posttraumatic stress disorders (10,48). These observations demonstrate that neuroendocrine alterations may depend on the conditions of chronic pain.

One of the theories of depression includes the dysregulation of intracellular pathways that are linked to neuroplasticity as key events (13,14). Among the second messenger cascades thought to play an important role in mediating the effects of stress and antidepressant treatments, the cAMP cascade can be cited. cAMP cascade was also implicated in the pain field. Indeed, inflammation (49,50) and neuropathic pain (51) increase CREB phosphorylation in the dorsal horn neurons and the intrathecal injection of CREB antisense oligonucleotide attenuates allodynia caused by partial sciatic nerve ligation (52). These results suggest that CREB is involved in both development and maintenance of chronic pain. However, there was no evidence that CREB activity changes after neuropathic pain may also affect limbic structures, which are associated with the affective-motivational component of pain. In this study, we determined CRE-related activity before (2 weeks PO) and after the development of depression-related phenotype (8 weeks PO) in neuropathic mice. Our results showed that CRE-related activity diminished in the outer portion of the granule cell layer of dentate gyrus at 8 weeks PO, whereas there were no differences between neuropathic and control mice at 2 weeks PO. These results suggest that the changes in CRE-mediated activity are not related to the nociceptive component of neuropathic pain but rather to its affective consequences. Indeed, several clinical (18,53) as well as preclinical studies (54) have demonstrated decreased CREB activity in limbic structures including hippocampus and frontal cortex in

depression. In contrast, CRE-mediated activity remained apparently unchanged in the CeA, BLA, and ACC of neuropathic mice, despite the known implication of these brain regions in pain (2,55). These negative data are, however, to be considered with caution. Indeed, the CRE-LacZ mice used in our study display high basal reporter activity, which provides a good detection of decreased CRE-mediated transcriptional activity but may not be sensitive enough to detect increased activity. Moreover, profound molecular or structural alterations (or both) may be present in a given brain region without implying CRE-mediated transcription. Further experiments are necessary to assess amygdalar and cingular role in the affective consequences of neuropathic pain.

In conclusion, this study establishes a direct connection between neuropathic pain and mood disorders. Our results demonstrate that the affective consequences of neuropathic pain evolve over time, showing the critical role of time. We also showed that the affective consequences of neuropathic pain are independent from HPA axis dysregulation. On the contrary, CRE-mediated transcription within limbic structures is one of the possible mechanism from which key affective consequences of neuropathic pain may result.

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the University of Strasbourg, and the Association des Fibromyalgiques d'Alsace. We thank Dr. Luc-Henri Tessier and Mr. Stéphane Doridot for their genotyping support.

Dr. Barrot reports having received lecture fees from Adir, and research contractor funding from Missions-Cadres SARL. Pr. Freund-Mercier reported research contractor funding from Institut de Recherches Internationales Servier and Adir. Drs. Barrot, Yalcin and Freund-Mercier reported a Centre National de la Recherche Scientifique–filed patent for new pain treatments. Y. Bohren, E. Waltisperger, D. Sage-Ciocca, and J.C. Yin reported no biomedical financial interests or potential conflicts of interest.

Supplementary material cited in this article is available online.

- Bair MJ, Robinson RL, Katon W, Kroenke K (2003): Depression and pain comorbidity: A literature review. *Arch Intern Med* 163:2433–2445.
- Maletic V, Raison CL (2009): Neurobiology of depression, fibromyalgia and neuropathic pain. *Front Biosci* 14:5291–5338.
- Gustorff B, Dörner T, Likar R, Grisold W, Lawrence K, Schwarz F, *et al.* (2008): Prevalence of self-reported neuropathic pain and impact on quality of life: A prospective representative survey. *Acta Anaesthesiol Scand* 52:132–136.
- Kontinen VK, Kauppila T, Paananen S, Pertovaara A, Kalso E (1999): Behavioural measures of depression and anxiety in rats with spinal nerve ligation-induced neuropathy. *Pain* 80:341–346.
- Hasnie FS, Wallace VC, Hefner K, Holmes A, Rice AS (2007): Mechanical and cold hypersensitivity in nerve-injured C57BL/6J mice is not associated with fear-avoidance- and depression-related behaviour. *Br J Anaesth* 98:816–822.
- Suzuki T, Amata M, Sakaue G, Nishimura S, Inoue T, Shibata M, *et al.* (2007): Experimental neuropathy in mice is associated with delayed behavioral changes related to anxiety and depression. *Anesth Analg* 104:1570–1577.
- Goncalves L, Silva R, Pinto-Ribeiro F, Pego JM, Bessa JM, Pertovaara A, *et al.* (2008): Neuropathic pain is associated with depressive behaviour and induces neuroplasticity in the amygdala of the rat. *Exp Neurol* 213: 48–56.
- Matsuzawa-Yanagida K, Narita M, Nakajima M, Kuzumaki N, Niikura K, Nozaki H, *et al.* (2008): Usefulness of antidepressants for improving the neuropathic pain-like state and pain-induced anxiety through actions at different brain sites. *Neuropsychopharmacology* 33:1952–1965.
- Parker KJ, Schatzberg AF, Lyons DM (2003): Neuroendocrine aspects of hypercortisolism in major depression. *Horm Behav* 43:60–66.
- Raison CL, Miller AH (2003): When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *Am J Psychiatry* 160:1554–1565.
- Krishnan V, Nestler EJ (2008): The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455:894–902.
- Sterlemann V, Ganea K, Liebl C, Harbich D, Alam S, Holsboer F, *et al.* (2008): Long-term behavioral and neuroendocrine alterations following chronic social stress in mice: Implications for stress-related disorders. *Horm Behav* 53:386–394.
- Tanis KQ, Duman RS (2007): Intracellular signaling pathways pave roads to recovery for mood disorders. *Ann Med* 39:531–544.
- Krishnan V, Nestler EJ (2010): Linking molecules to mood: New insight into the biology of depression. *Am J Psychiatry* 167:1305–1320.
- Thome J, Sakai N, Shin K, Steffen C, Zhang YJ, Impey S, *et al.* (2000): cAMP response element-mediated gene transcription is upregulated by chronic antidepressant treatment. *J Neurosci* 20:4030–4036.
- Chen AC, Shirayama Y, Shin KH, Neve RL, Duman RS (2001): Expression of the cAMP response element binding protein (CREB) in hippocampus produces an antidepressant effect. *Biol Psychiatry* 49:753–762.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002): Neurobiology of depression. *Neuron* 34:13–25.
- Yamada S, Yamamoto M, Ozawa H, Riederer P, Saito T (2003): Reduced phosphorylation of cyclic AMP-responsive element binding protein in the postmortem orbitofrontal cortex of patients with major depressive disorder. *J Neural Transm* 110:671–680.
- Carlezon WA Jr, Duman RS, Nestler EJ (2005): The many faces of CREB. *Trends Neurosci* 28:436–445.
- Cheng HY, Pitcher GM, Laviolette SR, Whishaw IQ, Tong KI, Kockeritz LK, *et al.* (2002): DREAM is a critical transcriptional repressor for pain modulation. *Cell* 108:31–43.
- Benbouzid M, Gaveriaux-Ruff C, Yalcin I, Waltisperger E, Tessier LH, Muller A, *et al.* (2008): Delta-opioid receptors are critical for tricyclic antidepressant treatment of neuropathic allodynia. *Biol Psychiatry* 63: 633–636.
- Benbouzid M, Pallage V, Rajalu M, Waltisperger E, Doridot S, Poisbeau P, *et al.* (2008): Sciatic nerve cuffing in mice: A model of sustained neuropathic pain. *Eur J Pain* 12:591–599.
- Yalcin I, Choucair-Jaafar N, Benbouzid M, Tessier LH, Muller A, Hein L, *et al.* (2009): beta(2)-adrenoceptors are critical for antidepressant treatment of neuropathic pain. *Ann Neurol* 65:218–225.
- Barrot M, Olivier JD, Perrotti LI, DiLeone RJ, Berton O, Eisch AJ, *et al.* (2002): CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11435–11440.
- Brodie CR, Khaliq M, Yin JC, Brent Clark H, Orr HT, Boland LM (2004): Overexpression of CREB reduces CRE-mediated transcription: Behavioral and cellular analyses in transgenic mice. *Mol Cell Neurosci* 25:602–611.
- Barrot M, Wallace DL, Bolanos CA, Graham DL, Perrotti LI, Neve RL, *et al.* (2005): Regulation of anxiety and initiation of sexual behavior by CREB in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8357–8362.
- Bohren Y, Karavelic D, Tessier LH, Yalcin I, Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL, *et al.* (2010): Mu-opioid receptors are not necessary for nortriptyline treatment of neuropathic allodynia. *Eur J Pain* 14:700–704.
- Zlomuzica A, Ruocco LA, Sadile AG, Huston JP, Dere E (2009): Histamine H1 receptor knockout mice exhibit impaired spatial memory in the eight-arm radial maze. *Br J Pharmacol* 157:86–91.
- Nicolas LB, Kolb Y, Prinssen EP (2006): A combined marble burying-locomotor activity test in mice: A practical screening test with sensitivity to different classes of anxiolytics and antidepressants. *Eur J Pharmacol* 547:106–115.
- Jacobson LH, Bettler B, Kaupmann K, Cryan JF (2007): Behavioral evaluation of mice deficient in GABA(B(1)) receptor isoforms in tests of unconditioned anxiety. *Psychopharmacology (Berl)* 190:541–553.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, *et al.* (2003): Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301:805–809.
- Yalcin I, Coubard S, Bodard S, Chalon S, Belzung C (2008): Effects of 5,7-dihydroxytryptamine lesion of the dorsal raphe nucleus on the antidepressant-like action of tramadol in the unpredictable chronic mild stress in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 200:497–507.
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977): Depression: A new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266:730–732.
- David DJ, Samuels BA, Rainer Q, Wang JW, Marsteller D, Mendez I, *et al.* (2009): Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* 62:479–493.

35. Cryan JF, Holmes A (2005): The ascent of mouse: Advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov* 4:775–790.
36. Mizoguchi K, Ishige A, Aburada M, Tabira T (2003): Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: Involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience* 119:887–897.
37. Wang S, Scott BW, Wojtowicz JM (2000): Heterogenous properties of dentate granule neurons in the adult rat. *J Neurobiol* 42:248–257.
38. Ambrogini P, Lattanzi D, Ciuffoli S, Agostini D, Bertini L, Stocchi V, *et al.* (2004): Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus. *Brain Res* 1017:21–31.
39. Koehl M, Lemaire V, Vallee M, Abrous N, Piazza PV, Mayo W, *et al.* (2001): Long term neurodevelopmental and behavioral effects of perinatal life events in rats. *Neurotox Res* 3:65–83.
40. Nair A, Vadodaria KC, Banerjee SB, Benekareddy M, Dias BG, Duman RS, *et al.* (2007): Stressor-specific regulation of distinct brain-derived neurotrophic factor transcripts and cyclic AMP response element-binding protein expression in the postnatal and adult rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 32:1504–1519.
41. Surget A, Wang Y, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Edgar N, Griebel G, *et al.* (2009): Corticolimbic transcriptome changes are state-dependent and region-specific in a rodent model of depression and of antidepressant reversal. *Neuropsychopharmacology* 34:1363–1380.
42. Elizalde N, Garcia-Garcia AL, Totterdell S, Gendive N, Venzala E, Ramirez MJ, *et al.* (2010): Sustained stress-induced changes in mice as a model for chronic depression. *Psychopharmacology (Berl)* 210:393–406.
43. Coyle JT, Duman RS (2003): Finding the intracellular signaling pathways affected by mood disorder treatments. *Neuron* 38:157–160.
44. Tsankova NM, Berton O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ (2006): Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci* 9:519–525.
45. Pittenger C, Duman RS (2008): Stress, depression, and neuroplasticity: A convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33:88–109.
46. Bomholt SF, Mikkelsen JD, Blackburn-Munro G (2005): Normal hypothalamo-pituitary-adrenal axis function in a rat model of peripheral neuropathic pain. *Brain Res* 1044:216–226.
47. Ulrich-Lai YM, Xie W, Meij JT, Dolgas CM, Yu L, Herman JP (2006): Limbic and HPA axis function in an animal model of chronic neuropathic pain. *Physiol Behav* 88:67–76.
48. Heim C, Ehler U, Hellhammer DH (2000): The potential role of hypocortisolism in the pathophysiology of stress-related bodily disorders. *Psychoneuroendocrinology* 25:1–35.
49. Ji RR, Rupp F (1997): Phosphorylation of transcription factor CREB in rat spinal cord after formalin-induced hyperalgesia: Relationship to c-fos induction. *J Neurosci* 17:1776–1785.
50. Duric V, McCarson KE (2007): Neurokinin-1 (NK-1) receptor and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene expression is differentially modulated in the rat spinal dorsal horn and hippocampus during inflammatory pain. *Mol Pain* 3:32.
51. Ma W, Quirion R (2001): Increased phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein (CREB) in the superficial dorsal horn neurons following partial sciatic nerve ligation. *Pain* 93:295–301.
52. Ma W, Hatzis C, Eisenach JC (2003): Intrathecal injection of cAMP response element binding protein (CREB) antisense oligonucleotide attenuates tactile allodynia caused by partial sciatic nerve ligation. *Brain Res* 988:97–104.
53. Dowlathshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT (1998): Increased temporal cortex CREB concentrations and antidepressant treatment in major depression. *Lancet* 352:1754–1755.
54. Itoh T, Abe K, Tokumura M, Horiuchi M, Inoue O, Ibii N (2003): Different regulation of adenylyl cyclase and rolipram-sensitive phosphodiesterase activity on the frontal cortex and hippocampus in learned helplessness rats. *Brain Res* 991:142–149.
55. Zhuo M (2006): Molecular mechanisms of pain in the anterior cingulate cortex. *J Neurosci Res* 84:927–933.

A Time-Dependent History of Mood Disorders in a Murine Model of Neuropathic Pain

Supplemental Information

Supplemental Methods & Materials

Animals

The CRE-LacZ line has been under C57BL/6J background for over 15 generations, male heterozygotes being bred with C57BL/6J females and mice genotyped upon weaning. Experiments started with 8 to 9 week old mice, group-housed five per cage and kept under a 12-hour light/dark cycle (lights on at 6:00 AM, except for behavioral experiments where lights were on at 8:00 PM). Food and water were available ad libitum. Before surgery, mice were assigned to the experimental groups so that these groups did not initially differ for the mechanical nociceptive threshold or for the body weight. Animal facilities are registered for animal experimentation (Agreement B67-482-1/C67-482-1). All procedures were performed in accordance with guidelines for animal experimentation of the International Association for the Study of Pain (IASP) and European Communities Council Directive 86/6609/EEC.

Immunohistochemistry

Sections were washed in phosphate-buffered saline (PBS) (3 x 10 min), incubated 15 min in a 3% H₂O₂ / 50% ethanol solution, washed in PBS (3 x 10 min) and pre-incubated in PBS containing Triton X-100 (0.2%) and 5% donkey serum for 45 min. Sections were then incubated overnight at room temperature in PBS containing Triton X-100 (0.2%), 1% donkey serum and a goat anti- β -gal primary antibody (1:1000; Biogenesis, Poole, UK). Sections were washed in PBS (3 x 10 min), incubated with a biotinylated horse anti-goat secondary antibody (1:400 in PBS with 0.2% Triton X-100, 1% donkey serum) for 1 h 30 min, washed in PBS (3 x 10 min) and incubated with PBS containing the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC kit; 0.2% A and 0.2% B; Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 1 h 30 min. After being washed in Tris-HCl buffer, sections were incubated in 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) and H₂O₂ in Tris-HCl for approximately 4 min and washed again. Sections were serially mounted on gelatine-coated slides, air dried, dehydrated in graded alcohols, cleared in Roti-Histol (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) and coverslipped with Eukitt.

Table S1. Effects of neuropathic pain on locomotor activity. Locomotor activity over 4 h was not affected by cuff implantation when tested at 4, 5 or 7 weeks post-operation (PO). Data are means $\pm$ SEM of photocells counts. (Cuff groups, $n = 10$ per PO time-point, Sham groups, $n = 10$ per PO time-point).

Photocells count	PO 4W	PO 5W	PO 7W
Sham	9687 $\pm$ 722	10243 $\pm$ 647	10454 $\pm$ 510
Cuff	10169 $\pm$ 885	9938 $\pm$ 880	10103 $\pm$ 661

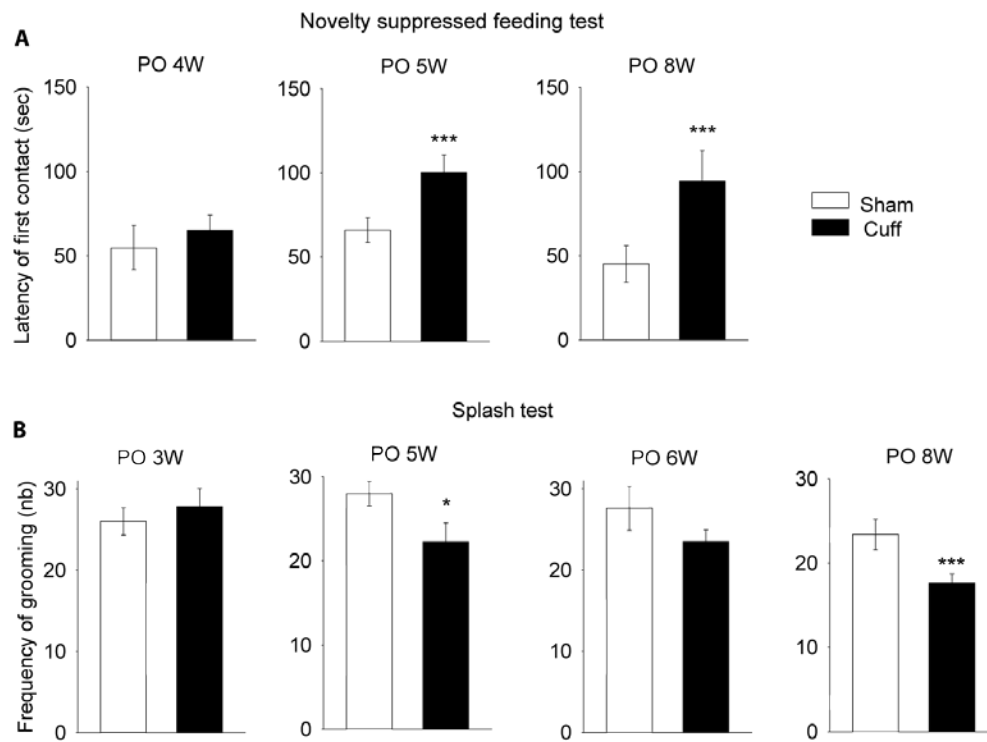


Figure S1. Neuropathic mice developed anxiety or depression-like phenotype in a time-dependent manner. **(A)** The latency to first contact was increased in Cuff mice in the novelty suppressed feeding test at 5 and 8 weeks post-operation (PO). **(B)** Cuff implantation induced reduction of grooming frequency during the splash test at 5 and 8 weeks PO. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. * $p < .05$, *** $p < .001$ Sham versus Cuff. (Cuff groups, $n = 10-12$ per PO time-point, Sham groups, $n = 10-12$ per PO time-point).

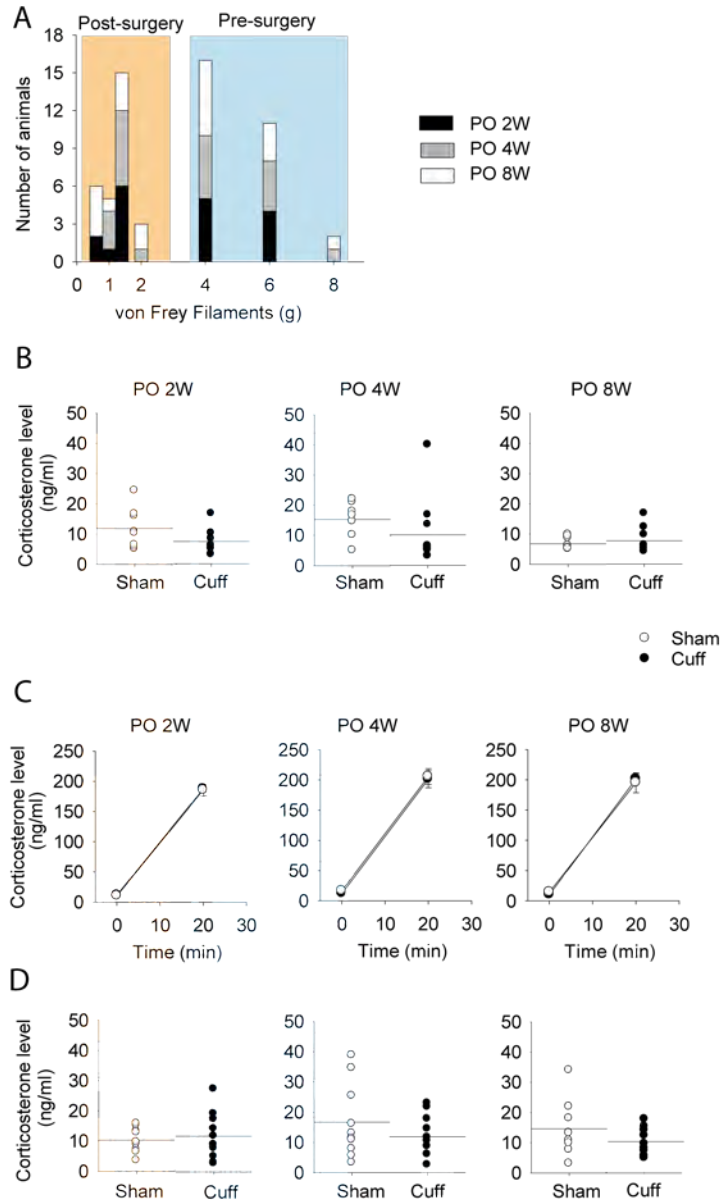


Figure S2. Hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity was not altered in neuropathic mice. **(A)** Individual von Frey data for the 2nd corticosterone-related experiment. Pre-surgery thresholds (blue area) were observed with either the 4, 6 or 8 g filament, while post-surgery thresholds (orange area) were observed with either the 2, 1.4, 1 or 0.8 g filament. The black, gray and white bars correspond to mice with blood sampling done at 2, 4 or 8 weeks post-operation (PO) respectively. All the cuff mice developed neuropathic allodynia. **(B)** Scatter plot of individual baseline plasma corticosterone levels for mice of the 2nd corticosterone-related experiment (cf. Figure 4). Cuff mice do not differ from Sham mice. **(C)** No difference was observed between Sham and Cuff mice for either baseline or stress-induced plasma corticosterone concentrations at 2, 4 and 8 weeks PO (1st corticosterone-related experiment). Plasma corticosterone level at rest and following a 20 min restraint stress was obtained from mice independent from the ones presented in Figure 4. **(D)** Scatter plot of individual baseline plasma corticosterone levels for mice of the 1st corticosterone-related experiment. Cuff mice do not differ from Sham mice. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. (Cuff groups, $n = 10$ per PO time-point, Sham groups, $n = 10$ per PO time-point).

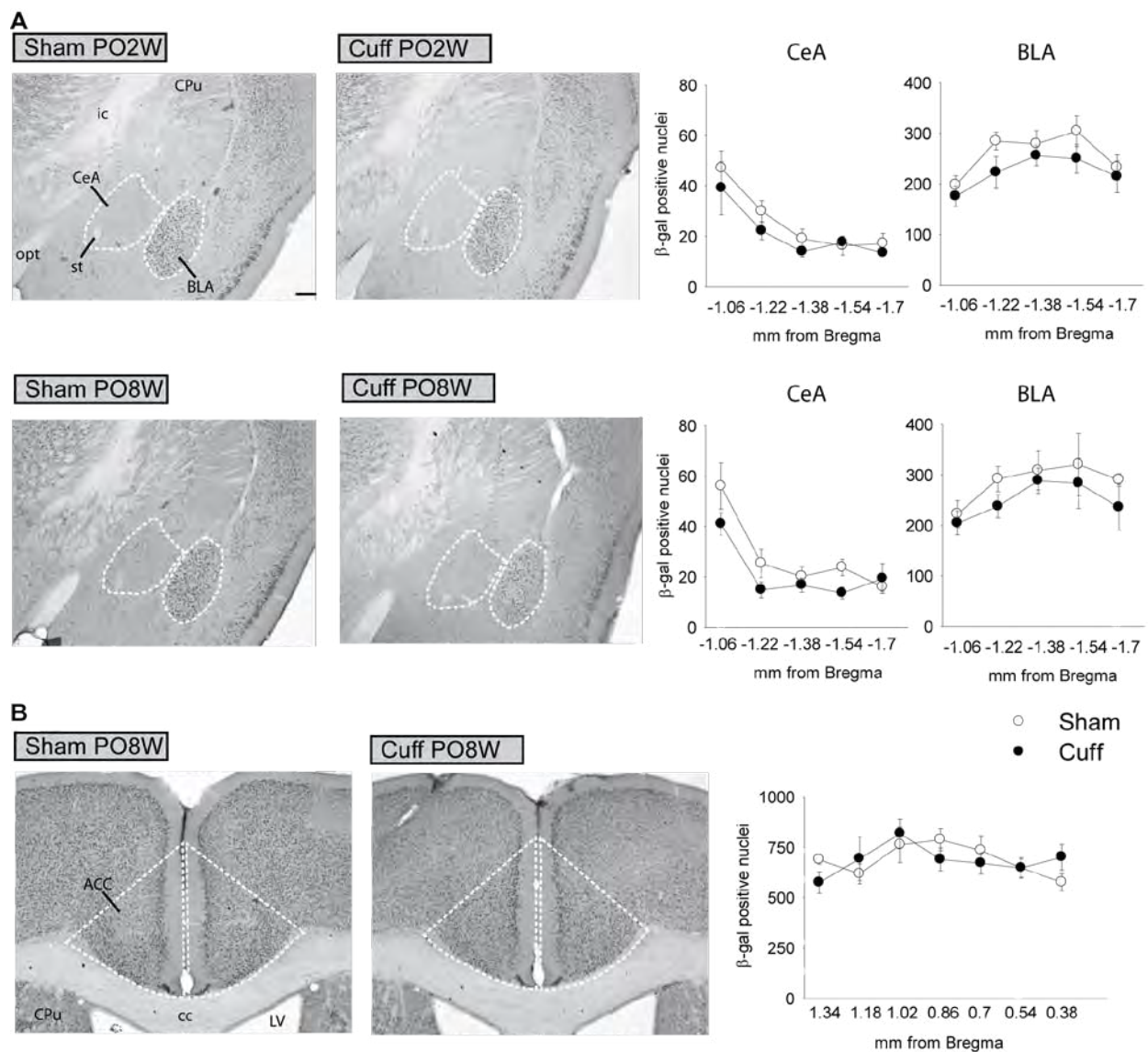


Figure S3. CRE-mediated activity in the amygdala and in the anterior cingulate cortex (ACC). Using a CRE-LacZ reporter line with high basal reporter activity, we observed no change in CRE-mediated activity in the central (CeA) and basolateral nucleus (BLA) of amygdala at 2 and 8 weeks post-operation (PO) and in the ACC at 8 weeks PO. The number of β -galactosidase (β -gal) positive nuclei was counted bilaterally, in the CeA and BLA, between -1.06 and -1.7 mm from the bregma and in the ACC, between 1.34 and 0.38 mm from the bregma. Scale bar = 200 μ m, applies to (A) and (B). The counted areas are outlined in the pictures. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. (Cuff groups, $n = 4$ -5 mice per PO time-point, Sham groups, $n = 4$ -5 mice per PO time-point). cc, corpus callosum; CPU, caudate putamen (striatum); CRE, cAMP response element; ic, internal capsule; LV, lateral ventricle; opt, optic tract; st, stria terminalis.

REFERENCES

- Aanonsen LM, Wilcox GL (1987) Nociceptive action of excitatory amino acids in the mouse: effects of spinally administered opioids, phencyclidine and sigma agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 243:9-19.
- Aley KO, Levine JD (1999) Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. *J Neurosci* 19:2181-2186.
- Aley KO, Reichling DB, Levine JD (1996) Vincristine hyperalgesia in the rat: a model of painful vincristine neuropathy in humans. *Neuroscience* 73:259-265.
- Ali Z, Raja SN, Wesselmann U, Fuchs PN, Meyer RA, Campbell JN (2000) Intradermal injection of norepinephrine evokes pain in patients with sympathetically maintained pain. *Pain* 88:161-168.
- Ali Z, Ringkamp M, Hartke TV, Chien HF, Flavahan NA, Campbell JN, Meyer RA (1999) Uninjured C-fiber nociceptors develop spontaneous activity and alpha-adrenergic sensitivity following L6 spinal nerve ligation in monkey. *J Neurophysiol* 81:455-466.
- Amir R, Kocsis JD, Devor M (2005) Multiple interacting sites of ectopic spike electrogenesis in primary sensory neurons. *J Neurosci* 25:2576-2585.
- Amir R, Argoff CE, Bennett GJ, Cummins TR, Durieux ME, Gerner P, Gold MS, Porreca F, Strichartz GR (2006) The role of sodium channels in chronic inflammatory and neuropathic pain. *J Pain* 7:S1-29.
- Anjaneyulu M, Chopra K (2004) Fluoxetine attenuates thermal hyperalgesia through 5-HT_{1/2} receptors in streptozotocin-induced diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 497:285-292.
- Anon. (2005) Duloxetine (Cymbalta) for neuropathic pain. *Med Lett Drugs Ther* 47:67-68.
- Ansari A (2000) The efficacy of newer antidepressants in the treatment of chronic pain: a review of current literature. *Harv Rev Psychiatry* 7:257-277.
- Apkarian AV, Baliki MN, Geha PY (2009) Towards a theory of chronic pain. *Prog Neurobiol* 87:81-97.
- Apkarian AV, Bushnell MC, Treede RD, Zubieta JK (2005) Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain* 9:463-484.
- Ardid D, Guilbaud G (1992) Antinociceptive effects of acute and 'chronic' injections of tricyclic antidepressant drugs in a new model of mononeuropathy in rats. *Pain* 49:279-287.
- Ardid D, Jourdan D, Mestre C, Villanueva L, Le Bars D, Eschalier A (1995) Involvement of bulbospinal pathways in the antinociceptive effect of clomipramine in the rat. *Brain Res* 695:253-256.
- Ardid D, Alloui A, Brousse G, Jourdan D, Picard P, Dubray C, Eschalier A (2001) Potentiation of the antinociceptive effect of clomipramine by a 5-HT_{1A} antagonist in neuropathic pain in rats. *Br J Pharmacol* 132:1118-1126.
- Armero P, Muriel C, Santos J, Sanchez-Montero FJ, Rodriguez RE, Gonzalez-Sarmiento R (2005) COMT (Val158Met) polymorphism is not associated to neuropathic pain in a Spanish population. *Eur J Pain* 9:229-232.
- Arner S, Meyerson BA (1988) Lack of analgesic effect of opioids on neuropathic and idiopathic forms of pain. *Pain* 33:11-23.
- Arsenault A, Sawynok J (2009) Perisurgical amitriptyline produces a preventive effect on afferent hypersensitivity following spared nerve injury. *Pain* 146:308-314.
- Ash G, Dickens CM, Creed FH, Jayson MI, Tomenson B (1999) The effects of dothiepin on subjects with rheumatoid arthritis and depression. *Rheumatology (Oxford)* 38:959-967.
- Attal N, Mazaltarine G, Perrouin-Verbe B, Albert T (2009) Chronic neuropathic pain management in spinal cord injury patients. What is the efficacy of pharmacological treatments with a general mode of administration? (oral, transdermal, intravenous). *Ann Phys Rehabil Med* 52:124-141.

- Attal N, Guirimand F, Brasseur L, Gaude V, Chauvin M, Bouhassira D (2002) Effects of IV morphine in central pain: a randomized placebo-controlled study. *Neurology* 58:554-563.
- Attal N, Cruccu G, Baron R, Haanpaa M, Hansson P, Jensen TS, Nurmikko T (2010) EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *Eur J Neurol* 17:1113-e1188.
- Attal N, Cruccu G, Haanpaa M, Hansson P, Jensen TS, Nurmikko T, Sampaio C, Sindrup S, Wiffen P (2006) EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain. *Eur J Neurol* 13:1153-1169.
- Back SK, Lee J, Hong SK, Na HS (2006) Loss of spinal mu-opioid receptor is associated with mechanical allodynia in a rat model of peripheral neuropathy. *Pain* 123:117-126.
- Bantel C, Eisenach JC, Duflo F, Tobin JR, Childers SR (2005) Spinal nerve ligation increases alpha2-adrenergic receptor G-protein coupling in the spinal cord. *Brain Res* 1038:76-82.
- Barger SW, Horster D, Furukawa K, Goodman Y, Krieglstein J, Mattson MP (1995) Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca²⁺ accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9328-9332.
- Baron R (2006) Mechanisms of disease: neuropathic pain--a clinical perspective. *Nat Clin Pract Neurol* 2:95-106.
- Barrot M, Yalcin I, LH. T, MJ. F-M (2010) Antidepressant treatment of neuropathic pain: looking for the mechanism. *Future Neurology* 5:247-257.
- Barrot M, Yalcin I, Choucair-Jaafar N, Benbouzid M, Freund-Mercier MJ (2009) From antidepressant drugs to beta-mimetics: preclinical insights on potential new treatments for neuropathic pain. *Recent Pat CNS Drug Discov* 4:182-189.
- Basbaum AI (1974) Effects of central lesions on disorders produced by multiple dorsal rhizotomy in rats. *Exp Neurol* 42:490-501.
- Bauer CS, Nieto-Rostro M, Rahman W, Tran-Van-Minh A, Ferron L, Douglas L, Kadurin I, Sri Ranjan Y, Fernandez-Alacid L, Millar NS, Dickenson AH, Lujan R, Dolphin AC (2009) The increased trafficking of the calcium channel subunit alpha2delta-1 to presynaptic terminals in neuropathic pain is inhibited by the alpha2delta ligand pregabalin. *J Neurosci* 29:4076-4088.
- Beggs S, Liu XJ, Kwan C, Salter MW (2010) Peripheral nerve injury and TRPV1-expressing primary afferent C-fibers cause opening of the blood-brain barrier. *Mol Pain* 6:74.
- Benbouzid M, Choucair-Jaafar N, Yalcin I, Waltisperger E, Muller A, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2008a) Chronic, but not acute, tricyclic antidepressant treatment alleviates neuropathic allodynia after sciatic nerve cuffing in mice. *Eur J Pain* 12:1008-1017.
- Benbouzid M, Pallage V, Rajalu M, Waltisperger E, Doridot S, Poisbeau P, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2008b) Sciatic nerve cuffing in mice: a model of sustained neuropathic pain. *Eur J Pain* 12:591-599.
- Benbouzid M, Gaveriaux-Ruff C, Yalcin I, Waltisperger E, Tessier LH, Muller A, Kieffer BL, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2008c) Delta-opioid receptors are critical for tricyclic antidepressant treatment of neuropathic allodynia. *Biol Psychiatry* 63:633-636.
- Benedetti F, Vighetti S, Amanzio M, Casadio C, Oliaro A, Bergamasco B, Maggi G (1998) Dose-response relationship of opioids in nociceptive and neuropathic postoperative pain. *Pain* 74:205-211.
- Bennett GJ, Xie YK (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33:87-107.

- Benoliel R, Epstein J, Eliav E, Jurevic R, Elad S (2007) Orofacial pain in cancer: part I--mechanisms. *J Dent Res* 86:491-505.
- Berger JV, Knaepen L, Janssen SP, Jaken RJ, Marcus MA, Joosten EA, Deumens R (2011) Cellular and molecular insights into neuropathy-induced pain hypersensitivity for mechanism-based treatment approaches. *Brain Res Rev* 67:282-310.
- Berrocchio E, Mico JA, Vitton O, Ladure P, Newman-Tancredi A, Depoortere R, Bardin L (2011) Evaluation of milnacipran, in comparison with amitriptyline, on cold and mechanical allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 655:46-51.
- Berry MA, Hargadon B, Shelley M, Parker D, Shaw DE, Green RH, Bradding P, Brightling CE, Wardlaw AJ, Pavord ID (2006) Evidence of a role of tumor necrosis factor alpha in refractory asthma. *N Engl J Med* 354:697-708.
- Bian D, Nichols ML, Ossipov MH, Lai J, Porreca F (1995) Characterization of the antiallodynic efficacy of morphine in a model of neuropathic pain in rats. *Neuroreport* 6:1981-1984.
- Binder W, Mousa SA, Sitte N, Kaiser M, Stein C, Schafer M (2004) Sympathetic activation triggers endogenous opioid release and analgesia within peripheral inflamed tissue. *Eur J Neurosci* 20:92-100.
- Birch PJ, Hayes AG, Sheehan MJ, Tyers MB (1987) Norbinaltorphimine: antagonist profile at kappa opioid receptors. *Eur J Pharmacol* 144:405-408.
- Birder LA, Perl ER (1999) Expression of alpha2-adrenergic receptors in rat primary afferent neurones after peripheral nerve injury or inflammation. *J Physiol* 515 (Pt 2):533-542.
- Blackburn-Munro G (2004) Pain-like behaviours in animals - how human are they? *Trends Pharmacol Sci* 25:299-305.
- Blackburn-Munro G, Blackburn-Munro RE (2001) Chronic pain, chronic stress and depression: coincidence or consequence? *J Neuroendocrinol* 13:1009-1023.
- Boas RA (1998) Sympathetic nerve blocks: in search of a role. *Reg Anesth Pain Med* 23:292-305.
- Bohn LM, Xu F, Gainetdinov RR, Caron MG (2000) Potentiated opioid analgesia in norepinephrine transporter knock-out mice. *J Neurosci* 20:9040-9045.
- Bomholt SF, Mikkelsen JD, Blackburn-Munro G (2005) Antinociceptive effects of the antidepressants amitriptyline, duloxetine, mirtazapine and citalopram in animal models of acute, persistent and neuropathic pain. *Neuropharmacology* 48:252-263.
- Bonica JJ (1990) Evolution and current status of pain programs. *J Pain Symptom Manage* 5:368-374.
- Borsook D, Becerra L (2009) Emotional pain without sensory pain--dream on? *Neuron* 61:153-155.
- Borzsei R, Pozsgai G, Bagoly T, Elekes K, Pinter E, Szolcsanyi J, Helyes Z (2008) Inhibitory action of endomorphin-1 on sensory neuropeptide release and neurogenic inflammation in rats and mice. *Neuroscience* 152:82-88.
- Bossut DF, Perl ER (1995) Effects of nerve injury on sympathetic excitation of A delta mechanical nociceptors. *J Neurophysiol* 73:1721-1723.
- Bostock H, Campero M, Serra J, Ochoa JL (2005) Temperature-dependent double spikes in C-nociceptors of neuropathic pain patients. *Brain* 128:2154-2163.
- Bouhassira D, Lanteri-Minet M, Attal N, Laurent B, Touboul C (2008) Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain* 136:380-387.
- Boureau F (1988) Du symptôme au syndrome douloureux chronique. In: *Pratique du traitement de la douleur* pp 71-79. Paris: Doin éditeurs.
- Bowie A, O'Neill LA (2000) Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol* 59:13-23.

- Bradley WG, Shapshak P, Delgado S, Nagano I, Stewart R, Rocha B (1998) Morphometric analysis of the peripheral neuropathy of AIDS. *Muscle Nerve* 21:1188-1195.
- Brau ME, Dreimann M, Olschewski A, Vogel W, Hempelmann G (2001) Effect of drugs used for neuropathic pain management on tetrodotoxin-resistant Na(+) currents in rat sensory neurons. *Anesthesiology* 94:137-144.
- Brennan F, Carr DB, Cousins M (2007) Pain management: a fundamental human right. *Anesth Analg* 105:205-221.
- Brightling C, Berry M, Amrani Y (2008) Targeting TNF-alpha: a novel therapeutic approach for asthma. *J Allergy Clin Immunol* 121:5-10; quiz 11-12.
- Briley M (2004) Clinical experience with dual action antidepressants in different chronic pain syndromes. *Hum Psychopharmacol* 19 Suppl 1:S21-25.
- Brown DR, Robertson MJ, Goldberg LI (1983) Reversal of morphine-induced catalepsy in the rat by narcotic antagonists and their quaternary derivatives. *Neuropharmacology* 22:317-321.
- Brown JP, Gee NS (1998) Cloning and deletion mutagenesis of the alpha2 delta calcium channel subunit from porcine cerebral cortex. Expression of a soluble form of the protein that retains [3H]gabapentin binding activity. *J Biol Chem* 273:25458-25465.
- Burchiel KJ (1984) Spontaneous impulse generation in normal and denervated dorsal root ganglia: sensitivity to alpha-adrenergic stimulation and hypoxia. *Exp Neurol* 85:257-272.
- Burgess SE, Gardell LR, Ossipov MH, Malan TP, Jr., Vanderah TW, Lai J, Porreca F (2002) Time-dependent descending facilitation from the rostral ventromedial medulla maintains, but does not initiate, neuropathic pain. *J Neurosci* 22:5129-5136.
- Busch-Dienstfertig M, Stein C (2010) Opioid receptors and opioid peptide-producing leukocytes in inflammatory pain--basic and therapeutic aspects. *Brain Behav Immun* 24:683-694.
- Butelman ER, Negus SS, Ai Y, de Costa BR, Woods JH (1993) Kappa opioid antagonist effects of systemically administered nor-binaltorphimine in a thermal antinociception assay in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 267:1269-1276.
- Cahana A, Carota A, Montadon ML, Annoni JM (2004) The long-term effect of repeated intravenous lidocaine on central pain and possible correlation in positron emission tomography measurements. *Anesth Analg* 98:1581-1584, table of contents.
- Campana WM (2007) Schwann cells: activated peripheral glia and their role in neuropathic pain. *Brain Behav Immun* 21:522-527.
- Campbell JN, Meyer RA (2006) Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron* 52:77-92.
- Campbell LC, Clauw DJ, Keefe FJ (2003) Persistent pain and depression: a biopsychosocial perspective. *Biol Psychiatry* 54:399-409.
- Canavero S, Bonicalzi V (2001) Reversible central pain. *Neurol Sci* 22:271-273.
- Canavero S, Bonicalzi V (2007) Central pain syndrome: elucidation of genesis and treatment. *Expert Rev Neurother* 7:1485-1497.
- Canciani L, Giaroni C, Zanetti E, Giuliani D, Pisani R, Moro E, Trinchera M, Crema F, Lecchini S, Frigo G (2006) Functional interaction between alpha2-adrenoceptors, mu- and kappa-opioid receptors in the guinea pig myenteric plexus: effect of chronic desipramine treatment. *Eur J Pharmacol* 553:269-279.
- Canti C, Nieto-Rostro M, Foucault I, Heblich F, Wratten J, Richards MW, Hendrich J, Douglas L, Page KM, Davies A, Dolphin AC (2005) The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of alpha2delta subunits is key to trafficking voltage-gated Ca2+ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11230-11235.
- Cao L, DeLeo JA (2008) CNS-infiltrating CD4+ T lymphocytes contribute to murine spinal nerve transection-induced neuropathic pain. *Eur J Immunol* 38:448-458.

- Cardenas DD, Felix ER (2009) Pain after spinal cord injury: a review of classification, treatment approaches, and treatment assessment. *PM R* 1:1077-1090.
- Cardenas DD, Warms CA, Turner JA, Marshall H, Brooke MM, Loeser JD (2002) Efficacy of amitriptyline for relief of pain in spinal cord injury: results of a randomized controlled trial. *Pain* 96:365-373.
- Catena-Dell'Osso M, Bellantuono C, Consoli G, Baroni S, Rotella F, Marazziti D (2011) Inflammatory and neurodegenerative pathways in depression: a new avenue for antidepressant development? *Curr Med Chem* 18:245-255.
- Chabal C, Jacobson L, Russell LC, Burchiel KJ (1992) Pain response to perineuromal injection of normal saline, epinephrine, and lidocaine in humans. *Pain* 49:9-12.
- Chappell AS, Ossanna MJ, Liu-Seifert H, Iyengar S, Skljarevski V, Li LC, Bennett RM, Collins H (2009) Duloxetine, a centrally acting analgesic, in the treatment of patients with osteoarthritis knee pain: a 13-week, randomized, placebo-controlled trial. *Pain* 146:253-260.
- Chattopadhyay S, Myers RR, Janes J, Shubayev V (2007) Cytokine regulation of MMP-9 in peripheral glia: implications for pathological processes and pain in injured nerve. *Brain Behav Immun* 21:561-568.
- Chen Y, Michaelis M, Janig W, Devor M (1996) Adrenoreceptor subtype mediating sympathetic-sensory coupling in injured sensory neurons. *J Neurophysiol* 76:3721-3730.
- Chiechio S, Copani A, Nicoletti F, Gereau RWt (2006a) L-acetylcarnitine: a proposed therapeutic agent for painful peripheral neuropathies. *Curr Neuropharmacol* 4:233-237.
- Chiechio S, Copani A, De Petris L, Morales ME, Nicoletti F, Gereau RWt (2006b) Transcriptional regulation of metabotropic glutamate receptor 2/3 expression by the NF-kappaB pathway in primary dorsal root ganglia neurons: a possible mechanism for the analgesic effect of L-acetylcarnitine. *Mol Pain* 2:20.
- Chizh BA (2007) Low dose ketamine: a therapeutic and research tool to explore N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated plasticity in pain pathways. *J Psychopharmacol* 21:259-271.
- Choi B, Rowbotham MC (1997) Effect of adrenergic receptor activation on post-herpetic neuralgia pain and sensory disturbances. *Pain* 69:55-63.
- Choi Y, Yoon YW, Na HS, Kim SH, Chung JM (1994) Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 59:369-376.
- Choucair-Jaafar N, Yalcin I, Rodeau JL, Waltisperger E, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2009) Beta2-adrenoceptor agonists alleviate neuropathic allodynia in mice after chronic treatment. *Br J Pharmacol* 158:1683-1694.
- Chung K, Yoon YW, Chung JM (1997) Sprouting sympathetic fibers form synaptic varicosities in the dorsal root ganglion of the rat with neuropathic injury. *Brain Res* 751:275-280.
- Chung K, Lee BH, Yoon YW, Chung JM (1996) Sympathetic sprouting in the dorsal root ganglia of the injured peripheral nerve in a rat neuropathic pain model. *J Comp Neurol* 376:241-252.
- Chung K, Kim HJ, Na HS, Park MJ, Chung JM (1993) Abnormalities of sympathetic innervation in the area of an injured peripheral nerve in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett* 162:85-88.
- Codd EE, Carson JR, Colburn RW, Stone DJ, Van Besien CR, Zhang SP, Wade PR, Gallantine EL, Meert TF, Molino L, Pullan S, Razler CM, Dax SL, Flores CM (2009) JNJ-20788560 [9-(8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-ylidene)-9H-xanthene-3-carboxylic acid diethylamide], a selective delta opioid receptor agonist, is a potent and efficacious

- antihyperalgesic agent that does not produce respiratory depression, pharmacologic tolerance, or physical dependence. *J Pharmacol Exp Ther* 329:241-251.
- Coffeen U, Manuel Ortega-Legaspi J, Lopez-Munoz FJ, Simon-Arceo K, Jaimes O, Pellicer F (2011) Insular cortex lesion diminishes neuropathic and inflammatory pain-like behaviours. *Eur J Pain* 15:132-138.
- Cok OY, Eker HE, Yalcin I, Barrot M, Aribogan A (2010) Is there a place for beta-mimetics in clinical management of neuropathic pain? Salbutamol therapy in six cases. *Anesthesiology* 112:1276-1279.
- Colburn RW, DeLeo JA, Rickman AJ, Yeager MP, Kwon P, Hickey WF (1997) Dissociation of microglial activation and neuropathic pain behaviors following peripheral nerve injury in the rat. *J Neuroimmunol* 79:163-175.
- Collins SL, Moore RA, McQuayHj, Wiffen P (2000) Antidepressants and anticonvulsants for diabetic neuropathy and postherpetic neuralgia: a quantitative systematic review. *J Pain Symptom Manage* 20:449-458.
- Colombo B, Annovazzi PO, Comi G (2006) Medications for neuropathic pain: current trends. *Neurol Sci* 27 Suppl 2:S183-189.
- Costigan M, Scholz J, Woolf CJ (2009a) Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci* 32:1-32.
- Costigan M, Moss A, Latremoliere A, Johnston C, Verma-Gandhu M, Herbert TA, Barrett L, Brenner GJ, Vardeh D, Woolf CJ, Fitzgerald M (2009b) T-cell infiltration and signaling in the adult dorsal spinal cord is a major contributor to neuropathic pain-like hypersensitivity. *J Neurosci* 29:14415-14422.
- Coull JA, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, Sik A, De Koninck P, De Koninck Y (2003) Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 424:938-942.
- Covington HE, 3rd, Vialou V, Nestler EJ (2010) From synapse to nucleus: novel targets for treating depression. *Neuropharmacology* 58:683-693.
- Crofford LJ, Lipsky PE, Brooks P, Abramson SB, Simon LS, van de Putte LB (2000) Basic biology and clinical application of specific cyclooxygenase-2 inhibitors. *Arthritis Rheum* 43:4-13.
- Croul S, Radziewsky A, Sverstiuk A, Murray M (1998) NK1, NMDA, 5HT1a, and 5HT2 receptor binding sites in the rat lumbar spinal cord: modulation following sciatic nerve crush. *Exp Neurol* 154:66-79.
- Cruccu G, Aziz TZ, Garcia-Larrea L, Hansson P, Jensen TS, Lefaucheur JP, Simpson BA, Taylor RS (2007) EFNS guidelines on neurostimulation therapy for neuropathic pain. *Eur J Neurol* 14:952-970.
- Cruccu G, Aminoff MJ, Curio G, Guerit JM, Kakigi R, Mauguiere F, Rossini PM, Treede RD, Garcia-Larrea L (2008) Recommendations for the clinical use of somatosensory-evoked potentials. *Clin Neurophysiol* 119:1705-1719.
- Cuzzocrea S, Chatterjee PK, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Britti D, Mazzullo G, Caputi AP, Thiemermann C (2002) Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates the development of acute and chronic inflammation. *Br J Pharmacol* 135:496-510.
- Davidoff G, Guarracini M, Roth E, Sliwa J, Yarkony G (1987) Trazodone hydrochloride in the treatment of dysesthetic pain in traumatic myelopathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Pain* 29:151-161.
- Davis JL, Lewis SB, Gerich JE, Kaplan RA, Schultz TA, Wallin JD (1977) Peripheral diabetic neuropathy treated with amitriptyline and fluphenazine. *JAMA* 238:2291-2292.

- Davis KD, Taub E, Duffner F, Lozano AM, Tasker RR, Houle S, Dostrovsky JO (2000) Activation of the anterior cingulate cortex by thalamic stimulation in patients with chronic pain: a positron emission tomography study. *J Neurosurg* 92:64-69.
- De Berardis D, Conti CM, Serroni N, Moschetta FS, Olivieri L, Carano A, Salerno RM, Cavuto M, Farina B, Alessandrini M, Janiri L, Pozzi G, Di Giannantonio M (2010) The effect of newer serotonin-noradrenalin antidepressants on cytokine production: a review of the current literature. *Int J Immunopathol Pharmacol* 23:417-422.
- De Salles AA, Bittar GT, Jr. (1994) Thalamic pain syndrome: anatomic and metabolic correlation. *Surg Neurol* 41:147-151.
- Decosterd I, Woolf CJ (2000) Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87:149-158.
- Decosterd I, Buchser E, Gilliard N, Saydoff J, Zurn AD, Aebischer P (1998) Intrathecal implants of bovine chromaffin cells alleviate mechanical allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 76:159-166.
- DeLeo JA, Yezierski RP (2001) The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. *Pain* 90:1-6.
- Dellemijn PL, Fields HL, Allen RR, McKay WR, Rowbotham MC (1994) The interpretation of pain relief and sensory changes following sympathetic blockade. *Brain* 117 (Pt 6):1475-1487.
- Dersh J, Polatin PB, Gatchel RJ (2002) Chronic pain and psychopathology: research findings and theoretical considerations. *Psychosom Med* 64:773-786.
- Desmeules JA, Kayser V, Weil-Fuggaza J, Bertrand A, Guilbaud G (1995) Influence of the sympathetic nervous system in the development of abnormal pain-related behaviours in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience* 67:941-951.
- Deval E, Noel J, Gasull X, Delaunay A, Alloui A, Friend V, Eschalier A, Lazdunski M, Lingueglia E (2011) Acid-sensing ion channels in postoperative pain. *J Neurosci* 31:6059-6066.
- Devor M (1983) Nerve pathophysiology and mechanisms of pain in causalgia. *J Auton Nerv Syst* 7:371-384.
- Devor M (2006) Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. *J Pain* 7:S3-S12.
- Devor M, Janig W (1981) Activation of myelinated afferents ending in a neuroma by stimulation of the sympathetic supply in the rat. *Neurosci Lett* 24:43-47.
- Devor M, Janig W, Michaelis M (1994) Modulation of activity in dorsal root ganglion neurons by sympathetic activation in nerve-injured rats. *J Neurophysiol* 71:38-47.
- Di Piero V, Jones AK, Iannotti F, Powell M, Perani D, Lenzi GL, Frackowiak RS (1991) Chronic pain: a PET study of the central effects of percutaneous high cervical cordotomy. *Pain* 46:9-12.
- Diatchenko L, Anderson AD, Slade GD, Fillingim RB, Shabalina SA, Higgins TJ, Sama S, Belfer I, Goldman D, Max MB, Weir BS, Maixner W (2006) Three major haplotypes of the beta2 adrenergic receptor define psychological profile, blood pressure, and the risk for development of a common musculoskeletal pain disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141B:449-462.
- Dib-Hajj S, Black JA, Felts P, Waxman SG (1996) Down-regulation of transcripts for Na channel alpha-SNS in spinal sensory neurons following axotomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14950-14954.
- Dib-Hajj SD, Fjell J, Cummins TR, Zheng Z, Fried K, LaMotte R, Black JA, Waxman SG (1999) Plasticity of sodium channel expression in DRG neurons in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Pain* 83:591-600.

- Dick IE, Brochu RM, Purohit Y, Kaczorowski GJ, Martin WJ, Priest BT (2007) Sodium channel blockade may contribute to the analgesic efficacy of antidepressants. *J Pain* 8:315-324.
- Dierich A, Kieffer BL (2004) Knockout mouse models in pain research. *Methods Mol Med* 99:269-299.
- Dong XW, Goregoaker S, Engler H, Zhou X, Mark L, Crona J, Terry R, Hunter J, Priestley T (2007) Small interfering RNA-mediated selective knockdown of Na(V)1.8 tetrodotoxin-resistant sodium channel reverses mechanical allodynia in neuropathic rats. *Neuroscience* 146:812-821.
- Drew GM, Siddall PJ, Duggan AW (2004) Mechanical allodynia following contusion injury of the rat spinal cord is associated with loss of GABAergic inhibition in the dorsal horn. *Pain* 109:379-388.
- Dubovy P, Jancalék R, Klusáková I, Svizenská I, Pejchalová K (2006) Intra- and extraneuronal changes of immunofluorescence staining for TNF- α and TNFR1 in the dorsal root ganglia of rat peripheral neuropathic pain models. *Cell Mol Neurobiol* 26:1205-1217.
- Dworkin RH, Clark WC, Lipsitz JD (1995) Pain responsivity in major depression and bipolar disorder. *Psychiatry Res* 56:173-181.
- Dworkin RH, O'Connor AB, Backonja M, Farrar JT, Finnerup NB, Jensen TS, Kalso EA, Loeser JD, Miaskowski C, Nurmikko TJ, Portenoy RK, Rice AS, Stacey BR, Treede RD, Turk DC, Wallace MS (2007) Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain* 132:237-251.
- Dworkin RH et al. (2003) Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *Arch Neurol* 60:1524-1534.
- Dykes RW, Avendano C, Leclerc SS (1995) Evolution of cortical responsiveness subsequent to multiple forelimb nerve transections: an electrophysiological study in adult cat somatosensory cortex. *J Comp Neurol* 354:333-344.
- Ebenezer GJ, McArthur JC, Thomas D, Murinson B, Hauer P, Polydefkis M, Griffin JW (2007) Denervation of skin in neuropathies: the sequence of axonal and Schwann cell changes in skin biopsies. *Brain* 130:2703-2714.
- Edwards T (2005) Inflammation, pain, and chronic disease: an integrative approach to treatment and prevention. *Altern Ther Health Med* 11:20-27; quiz 28, 75.
- Ekberg J, Jayamanne A, Vaughan CW, Aslan S, Thomas L, Mould J, Drinkwater R, Baker MD, Abrahamsen B, Wood JN, Adams DJ, Christie MJ, Lewis RJ (2006) μ O-conotoxin MrVIB selectively blocks Nav1.8 sensory neuron specific sodium channels and chronic pain behavior without motor deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17030-17035.
- Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES (2000) The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 52:595-638.
- Empl M, Renaud S, Erne B, Fuhr P, Straube A, Schaeren-Wiemers N, Steck AJ (2001) TNF- α expression in painful and nonpainful neuropathies. *Neurology* 56:1371-1377.
- Endoh T, Matsuura H, Tanaka C, Nagase H (1992) Nor-binaltorphimine: a potent and selective kappa-opioid receptor antagonist with long-lasting activity in vivo. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 316:30-42.
- Esser MJ, Sawynok J (1999) Acute amitriptyline in a rat model of neuropathic pain: differential symptom and route effects. *Pain* 80:643-653.
- Esser MJ, Chase T, Allen GV, Sawynok J (2001) Chronic administration of amitriptyline and caffeine in a rat model of neuropathic pain: multiple interactions. *Eur J Pharmacol* 430:211-218.

- Estebe JP, Myers RR (2004) Amitriptyline neurotoxicity: dose-related pathology after topical application to rat sciatic nerve. *Anesthesiology* 100:1519-1525.
- Evans S, Fishman B, Spielman L, Haley A (2003) Randomized trial of cognitive behavior therapy versus supportive psychotherapy for HIV-related peripheral neuropathic pain. *Psychosomatics* 44:44-50.
- Fagundes-Pereyra WJ, Teixeira MJ, Reyns N, Touzet G, Dantas S, Laureau E, Blond S (2010) Motor cortex electric stimulation for the treatment of neuropathic pain. *Arq Neuropsiquiatr* 68:923-929.
- Fath MA, Hassanein MR, James JI (1983) Congenital absence of pain. A family study. *J Bone Joint Surg Br* 65:186-188.
- Feighner JP (1999) Mechanism of action of antidepressant medications. *J Clin Psychiatry* 60 Suppl 4:4-11; discussion 12-13.
- Felts PA, Yokoyama S, Dib-Hajj S, Black JA, Waxman SG (1997) Sodium channel alpha-subunit mRNAs I, II, III, NaG, Na6 and hNE (PN1): different expression patterns in developing rat nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 45:71-82.
- Fernyhough P, Smith DR, Schapansky J, Van Der Ploeg R, Gardiner NJ, Tweed CW, Kontos A, Freeman L, Purves-Tyson TD, Glazner GW (2005) Activation of nuclear factor-kappaB via endogenous tumor necrosis factor alpha regulates survival of axotomized adult sensory neurons. *J Neurosci* 25:1682-1690.
- Field MJ, Cox PJ, Stott E, Melrose H, Offord J, Su TZ, Bramwell S, Corradini L, England S, Winks J, Kinloch RA, Hendrich J, Dolphin AC, Webb T, Williams D (2006) Identification of the alpha2-delta-1 subunit of voltage-dependent calcium channels as a molecular target for pain mediating the analgesic actions of pregabalin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17537-17542.
- Filliol D, Ghazizadeh S, Chluba J, Martin M, Matthes HW, Simonin F, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Dierich A, LeMeur M, Valverde O, Maldonado R, Kieffer BL (2000) Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nat Genet* 25:195-200.
- Finnerup NB, Sindrup SH, Jensen TS (2010) The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. *Pain* 150:573-581.
- Finnerup NB, Otto M, McQuay HJ, Jensen TS, Sindrup SH (2005) Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. *Pain* 118:289-305.
- Fishbain DA, Cutler R, Rosomoff HL, Rosomoff RS (2000) Evidence-based data from animal and human experimental studies on pain relief with antidepressants: a structured review. *Pain Med* 1:310-316.
- Flor H, Elbert T, Knecht S, Wienbruch C, Pantev C, Birbaumer N, Larbig W, Taub E (1995) Phantom-limb pain as a perceptual correlate of cortical reorganization following arm amputation. *Nature* 375:482-484.
- Fu ES, Zhang YP, Sagen J, Candiotti KA, Morton PD, Liebl DJ, Bethea JR, Brambilla R (2010) Transgenic inhibition of glial NF-kappa B reduces pain behavior and inflammation after peripheral nerve injury. *Pain* 148:509-518.
- Fukuoka T, Kobayashi K, Yamanaka H, Obata K, Dai Y, Noguchi K (2008) Comparative study of the distribution of the alpha-subunits of voltage-gated sodium channels in normal and axotomized rat dorsal root ganglion neurons. *J Comp Neurol* 510:188-206.
- Galer BS, Gianas A, Jensen MP (2000) Painful diabetic polyneuropathy: epidemiology, pain description, and quality of life. *Diabetes Res Clin Pract* 47:123-128.
- Gallagher RM, Moore P, Chernoff I (1995) The reliability of depression diagnosis in chronic low back pain. A pilot study. *Gen Hosp Psychiatry* 17:399-413.

- Gardell LR, Vanderah TW, Gardell SE, Wang R, Ossipov MH, Lai J, Porreca F (2003) Enhanced evoked excitatory transmitter release in experimental neuropathy requires descending facilitation. *J Neurosci* 23:8370-8379.
- Garrison CJ, Dougherty PM, Kajander KC, Carlton SM (1991) Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. *Brain Res* 565:1-7.
- Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL (2002) Opioid receptor genes inactivated in mice: the highlights. *Neuropeptides* 36:62-71.
- Gaveriaux-Ruff C, Karchewski LA, Hever X, Matifas A, Kieffer BL (2008) Inflammatory pain is enhanced in delta opioid receptor-knockout mice. *Eur J Neurosci* 27:2558-2567.
- Gaveriaux-Ruff C, Nozaki C, Nadal X, Hever XC, Weibel R, Matifas A, Reiss D, Filliol D, Nassar MA, Wood JN, Maldonado R, Kieffer BL (2011) Genetic ablation of delta opioid receptors in nociceptive sensory neurons increases chronic pain and abolishes opioid analgesia. *Pain* 152:1238-1248.
- George A, Marziniak M, Schafers M, Toyka KV, Sommer C (2000) Thalidomide treatment in chronic constrictive neuropathy decreases endoneurial tumor necrosis factor- α , increases interleukin-10 and has long-term effects on spinal cord dorsal horn met-enkephalin. *Pain* 88:267-275.
- Gerke MB, Duggan AW, Xu L, Siddall PJ (2003) Thalamic neuronal activity in rats with mechanical allodynia following contusive spinal cord injury. *Neuroscience* 117:715-722.
- Ghelardini C, Galeotti N, Bartolini A (2000) Antinociception induced by amitriptyline and imipramine is mediated by α 2A-adrenoceptors. *Jpn J Pharmacol* 82:130-137.
- Ghosh P, Tan TH, Rice NR, Sica A, Young HA (1993) The interleukin 2 CD28-responsive complex contains at least three members of the NF kappa B family: c-Rel, p50, and p65. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1696-1700.
- Giaroni C, Canciani L, Zanetti E, Giuliani D, Pisani R, Oldrini R, Moro E, Trinchera M, Crema F, Lecchini S, Frigo G (2008) Effects of chronic desipramine treatment on α 2-adrenoceptors and μ -opioid receptors in the guinea pig cortex and hippocampus. *Eur J Pharmacol* 579:116-125.
- Gibbins IL, Furness JB, Costa M (1987) Pathway-specific patterns of the co-existence of substance P, calcitonin gene-related peptide, cholecystokinin and dynorphin in neurons of the dorsal root ganglia of the guinea-pig. *Cell Tissue Res* 248:417-437.
- Gilron I, Watson CP, Cahill CM, Moulin DE (2006) Neuropathic pain: a practical guide for the clinician. *CMAJ* 175:265-275.
- Glynn CJ, Jamous MA, Teddy PJ, Moore RA, Lloyd JW (1986) Role of spinal noradrenergic system in transmission of pain in patients with spinal cord injury. *Lancet* 2:1249-1250.
- Gold MS, Levine JD (1996) DAMGO inhibits prostaglandin E2-induced potentiation of a TTX-resistant Na^+ current in rat sensory neurons in vitro. *Neurosci Lett* 212:83-86.
- Gold MS, Weinreich D, Kim CS, Wang R, Treanor J, Porreca F, Lai J (2003) Redistribution of $\text{Na(V)}1.8$ in uninjured axons enables neuropathic pain. *J Neurosci* 23:158-166.
- Goldstein DJ, Lu Y, Detke MJ, Lee TC, Iyengar S (2005) Duloxetine vs. placebo in patients with painful diabetic neuropathy. *Pain* 116:109-118.
- Goncalves L, Almeida A, Pertovaara A (2007) Pronociceptive changes in response properties of rostroventromedial medullary neurons in a rat model of peripheral neuropathy. *Eur J Neurosci* 26:2188-2195.
- Goncalves L, Silva R, Pinto-Ribeiro F, Pego JM, Bessa JM, Pertovaara A, Sousa N, Almeida A (2008) Neuropathic pain is associated with depressive behaviour and induces neuroplasticity in the amygdala of the rat. *Exp Neurol* 213:48-56.

- Goodman Y, Bruce AJ, Cheng B, Mattson MP (1996) Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons. *J Neurochem* 66:1836-1844.
- Gordh T, Chu H, Sharma HS (2006) Spinal nerve lesion alters blood-spinal cord barrier function and activates astrocytes in the rat. *Pain* 124:211-221.
- Gordon NC, Heller PH, Gear RW, Levine JD (1994) Interactions between fluoxetine and opiate analgesia for postoperative dental pain. *Pain* 58:85-88.
- Grace PM, Rolan PE, Hutchinson MR (2011) Peripheral immune contributions to the maintenance of central glial activation underlying neuropathic pain. *Brain Behav Immun*.
- Gray AM, Spencer PS, Sewell RD (1998) The involvement of the opioidergic system in the antinociceptive mechanism of action of antidepressant compounds. *Br J Pharmacol* 124:669-674.
- Grill RJ (2005) User-defined variables that affect outcome in spinal cord contusion/compression models. *Exp Neurol* 196:1-5.
- Guan Y, Johannek LM, Hartke TV, Shim B, Tao YX, Ringkamp M, Meyer RA, Raja SN (2008) Peripherally acting mu-opioid receptor agonist attenuates neuropathic pain in rats after L5 spinal nerve injury. *Pain* 138:318-329.
- Guieu R, Sampieri F, Pouget J, Guy B, Rochat H (1994) Adenosine in painful legs and moving toes syndrome. *Clin Neuropharmacol* 17:460-469.
- Guieu R, Peragut JC, Roussel P, Hassani H, Sampieri F, Bechis G, Gola R, Rochat H (1996) Adenosine and neuropathic pain. *Pain* 68:271-274.
- Guilbaud G, Benoist JM, Jazat F, Gautron M (1990) Neuronal responsiveness in the ventrobasal thalamic complex of rats with an experimental peripheral mononeuropathy. *J Neurophysiol* 64:1537-1554.
- Guirimand F (2003) [Recent data on the physiology of pain]. *Nephrologie* 24:401-407.
- Guirimand F, Le Bars D (1996) [Physiology of nociception]. *Ann Fr Anesth Reanim* 15:1048-1079.
- Gursoy S, Erdal E, Herken H, Madenci E, Alasehirli B, Erdal N (2003) Significance of catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in fibromyalgia syndrome. *Rheumatol Int* 23:104-107.
- Habler HJ, Janig W, Koltzenburg M (1987) Activation of unmyelinated afferents in chronically lesioned nerves by adrenaline and excitation of sympathetic efferents in the cat. *Neurosci Lett* 82:35-40.
- Hains BC, Waxman SG (2007) Sodium channel expression and the molecular pathophysiology of pain after SCI. *Prog Brain Res* 161:195-203.
- Hains BC, Saab CY, Waxman SG (2005) Changes in electrophysiological properties and sodium channel Nav1.3 expression in thalamic neurons after spinal cord injury. *Brain* 128:2359-2371.
- Hains BC, Saab CY, Waxman SG (2006) Alterations in burst firing of thalamic VPL neurons and reversal by Na(v)1.3 antisense after spinal cord injury. *J Neurophysiol* 95:3343-3352.
- Hains BC, Klein JP, Saab CY, Craner MJ, Black JA, Waxman SG (2003) Upregulation of sodium channel Nav1.3 and functional involvement in neuronal hyperexcitability associated with central neuropathic pain after spinal cord injury. *J Neurosci* 23:8881-8892.
- Hall FS, Schwarzbaum JM, Perona MT, Templin JS, Caron MG, Lesch KP, Murphy DL, Uhl GR (2011) A greater role for the norepinephrine transporter than the serotonin transporter in murine nociception. *Neuroscience* 175:315-327.

- Hama A, Sagen J (2007) Behavioral characterization and effect of clinical drugs in a rat model of pain following spinal cord compression. *Brain Res* 1185:117-128.
- Hammack JE, Michalak JC, Loprinzi CL, Sloan JA, Novotny PJ, Soori GS, Tirona MT, Rowland KM, Jr., Stella PJ, Johnson JA (2002) Phase III evaluation of nortriptyline for alleviation of symptoms of cis-platinum-induced peripheral neuropathy. *Pain* 98:195-203.
- Hamon M, Gozlan H, Bourgoin S, Benoliel JJ, Mauborgne A, Taquet H, Cesselin F, Mico JA (1987) Opioid receptors and neuropeptides in the CNS in rats treated chronically with amoxapine or amitriptyline. *Neuropharmacology* 26:531-539.
- Han DW, Kweon TD, Kim KJ, Lee JS, Chang CH, Lee YW (2006) Does the tibial and sural nerve transection model represent sympathetically independent pain? *Yonsei Med J* 47:847-851.
- Hao JX, Yu W, Xu XJ (1998) Evidence that spinal endogenous opioidergic systems control the expression of chronic pain-related behaviors in spinally injured rats. *Exp Brain Res* 118:259-268.
- Harati Y, Gooch C, Swenson M, Edelman S, Greene D, Raskin P, Donofrio P, Cornblath D, Sachdeo R, Siu CO, Kamin M (1998) Double-blind randomized trial of tramadol for the treatment of the pain of diabetic neuropathy. *Neurology* 50:1842-1846.
- Harris JA, Corsi M, Quartaroli M, Arban R, Bentivoglio M (1996) Upregulation of spinal glutamate receptors in chronic pain. *Neuroscience* 74:7-12.
- Hashioka S (2011) Antidepressants and neuroinflammation: can antidepressants calm glial rage down? *Mini Rev Med Chem* 11:555-564.
- Hassenbusch SJ, Gunes S, Wachsman S, Willis KD (2002) Intrathecal clonidine in the treatment of intractable pain: a phase I/II study. *Pain Med* 3:85-91.
- Hayashida K, Clayton BA, Johnson JE, Eisenach JC (2008) Brain derived nerve growth factor induces spinal noradrenergic fiber sprouting and enhances clonidine analgesia following nerve injury in rats. *Pain* 136:348-355.
- Herradon G, Ezquerra L, Nguyen T, Wang C, Siso A, Franklin B, Dilorenzo L, Rossenfeld J, Silos-Santiago I, Alguacil LF (2008) Noradrenergic and opioidergic alterations in neuropathy in different rat strains. *Neurosci Lett* 438:186-189.
- Heumann R, Korsching S, Bandtlow C, Thoenen H (1987) Changes of nerve growth factor synthesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transection. *J Cell Biol* 104:1623-1631.
- Hingtgen CM, Waite KJ, Vasko MR (1995) Prostaglandins facilitate peptide release from rat sensory neurons by activating the adenosine 3',5'-cyclic monophosphate transduction cascade. *J Neurosci* 15:5411-5419.
- Hirato M, Watanabe K, Takahashi A, Hayase N, Horikoshi S, Shibasaki T, Ohye C (1994) Pathophysiology of central (thalamic) pain: combined change of sensory thalamus with cerebral cortex around central sulcus. *Stereotact Funct Neurosurg* 62:300-303.
- Hirschfeld RM, Mallinckrodt C, Lee TC, Detke MJ (2005) Time course of depression-symptom improvement during treatment with duloxetine. *Depress Anxiety* 21:170-177.
- Ho KY, Huh BK, White WD, Yeh CC, Miller EJ (2008) Topical amitriptyline versus lidocaine in the treatment of neuropathic pain. *Clin J Pain* 24:51-55.
- Holdridge SV, Cahill CM (2007) Spinal administration of a delta opioid receptor agonist attenuates hyperalgesia and allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Eur J Pain* 11:685-693.
- Honda M, Uchida K, Tanabe M, Ono H (2006) Fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, exerts its antiallodynic effects on neuropathic pain in mice via 5-HT_{2A/2C} receptors. *Neuropharmacology* 51:866-872.

- Hong S, Morrow TJ, Paulson PE, Isom LL, Wiley JW (2004) Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in tetrodotoxin-sensitive and -resistant sodium channels in dorsal root ganglion neurons in the rat. *J Biol Chem* 279:29341-29350.
- Hsieh JC, Belfrage M, Stone-Elander S, Hansson P, Ingvar M (1995) Central representation of chronic ongoing neuropathic pain studied by positron emission tomography. *Pain* 63:225-236.
- Hudmon A, Choi JS, Tyrrell L, Black JA, Rush AM, Waxman SG, Dib-Hajj SD (2008) Phosphorylation of sodium channel Na(v)1.8 by p38 mitogen-activated protein kinase increases current density in dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 28:3190-3201.
- Hulsebosch CE, Hains BC, Crown ED, Carlton SM (2009) Mechanisms of chronic central neuropathic pain after spinal cord injury. *Brain Res Rev* 60:202-213.
- Huse E, Larbig W, Flor H, Birbaumer N (2001) The effect of opioids on phantom limb pain and cortical reorganization. *Pain* 90:47-55.
- Huyser BA, Parker JC (1999) Negative affect and pain in arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 25:105-121, vi.
- Hwang J, Zheng LT, Ock J, Lee MG, Kim SH, Lee HW, Lee WH, Park HC, Suk K (2008) Inhibition of glial inflammatory activation and neurotoxicity by tricyclic antidepressants. *Neuropharmacology* 55:826-834.
- Hwang SW, Oh U (2007) Current concepts of nociception: nociceptive molecular sensors in sensory neurons. *Curr Opin Anaesthesiol* 20:427-434.
- Iadarola MJ, Max MB, Berman KF, Byas-Smith MG, Coghill RC, Gracely RH, Bennett GJ (1995) Unilateral decrease in thalamic activity observed with positron emission tomography in patients with chronic neuropathic pain. *Pain* 63:55-64.
- IASP Web site. In: <http://www.iasp-pain.org>.
- Ibuki T, Hama AT, Wang XT, Pappas GD, Sagen J (1997) Loss of GABA-immunoreactivity in the spinal dorsal horn of rats with peripheral nerve injury and promotion of recovery by adrenal medullary grafts. *Neuroscience* 76:845-858.
- Ignatowski TA, Sud R, Reynolds JL, Knight PR, Spengler RN (2005) The dissipation of neuropathic pain paradoxically involves the presence of tumor necrosis factor- α (TNF). *Neuropharmacology* 48:448-460.
- Ikeda T, Ishida Y, Naono R, Takeda R, Abe H, Nakamura T, Nishimori T (2009) Effects of intrathecal administration of newer antidepressants on mechanical allodynia in rat models of neuropathic pain. *Neurosci Res* 63:42-46.
- Inchiosa MA, Jr., Kizelshteyn G (2008) Treatment of complex regional pain syndrome type I with oral phenoxybenzamine: rationale and case reports. *Pain Pract* 8:125-132.
- Israel N, Hazan U, Alcamí J, Munier A, Arenzana-Seisdedos F, Bachelier F, Israel A, Virelizier JL (1989) Tumor necrosis factor stimulates transcription of HIV-1 in human T lymphocytes, independently and synergistically with mitogens. *J Immunol* 143:3956-3960.
- Iyengar S, Webster AA, Hemrick-Luecke SK, Xu JY, Simmons RM (2004) Efficacy of duloxetine, a potent and balanced serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor in persistent pain models in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 311:576-584.
- Janig W, Koltzenburg M (1991) Plasticity of sympathetic reflex organization following cross-union of inappropriate nerves in the adult cat. *J Physiol* 436:309-323.
- Janig W, Habler HJ (2000) Specificity in the organization of the autonomic nervous system: a basis for precise neural regulation of homeostatic and protective body functions. *Prog Brain Res* 122:351-367.

- Jarvis MF et al. (2007) A-803467, a potent and selective Nav1.8 sodium channel blocker, attenuates neuropathic and inflammatory pain in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8520-8525.
- Jasmin L, Tien D, Weinshenker D, Palmiter RD, Green PG, Janni G, Ohara PT (2002) The NK1 receptor mediates both the hyperalgesia and the resistance to morphine in mice lacking noradrenaline. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1029-1034.
- Jensen TS (2002) Anticonvulsants in neuropathic pain: rationale and clinical evidence. *Eur J Pain* 6 Suppl A:61-68.
- Jett MF, McGuirk J, Waligora D, Hunter JC (1997) The effects of mexiletine, desipramine and fluoxetine in rat models involving central sensitization. *Pain* 69:161-169.
- Johnson M, Rennard S (2001) Alternative mechanisms for long-acting beta(2)-adrenergic agonists in COPD. *Chest* 120:258-270.
- Jones CK, Peters SC, Shannon HE (2005) Efficacy of duloxetine, a potent and balanced serotonergic and noradrenergic reuptake inhibitor, in inflammatory and acute pain models in rodents. *J Pharmacol Exp Ther* 312:726-732.
- Jones KL, Finn DP, Governo RJ, Prior MJ, Morris PG, Kendall DA, Marsden CA, Chapman V (2009) Identification of discrete sites of action of chronic treatment with desipramine in a model of neuropathic pain. *Neuropharmacology* 56:405-413.
- Jorum E, Warncke T, Stubhaug A (2003) Cold allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: the effect of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist ketamine--a double-blind, cross-over comparison with alfentanil and placebo. *Pain* 101:229-235.
- Joshi SK, Mikusa JP, Hernandez G, Baker S, Shieh CC, Neelands T, Zhang XF, Niforatos W, Kage K, Han P, Krafte D, Faltynek C, Sullivan JP, Jarvis MF, Honore P (2006) Involvement of the TTX-resistant sodium channel Nav 1.8 in inflammatory and neuropathic, but not post-operative, pain states. *Pain* 123:75-82.
- Junker V, Becker A, Huhne R, Zembatov M, Ravati A, Culmsee C, Kriegelstein J (2002) Stimulation of beta-adrenoceptors activates astrocytes and provides neuroprotection. *Eur J Pharmacol* 446:25-36.
- Kabli N, Cahill CM (2007) Anti-allodynic effects of peripheral delta opioid receptors in neuropathic pain. *Pain* 127:84-93.
- Kaltschmidt B, Kaltschmidt C (2009) NF-kappaB in the nervous system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a001271.
- Katayama Y, Tsubokawa T, Hirayama T, Kido G, Tsukiyama T, Iio M (1986) Response of regional cerebral blood flow and oxygen metabolism to thalamic stimulation in humans as revealed by positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab* 6:637-641.
- Kavaliers M (1988) Evolutionary and comparative aspects of nociception. *Brain Res Bull* 21:923-931.
- Kawamata M, Omote K (1996) Involvement of increased excitatory amino acids and intracellular Ca²⁺ concentration in the spinal dorsal horn in an animal model of neuropathic pain. *Pain* 68:85-96.
- Kawasaki Y, Kohno T, Ji RR (2006) Different effects of opioid and cannabinoid receptor agonists on C-fiber-induced extracellular signal-regulated kinase activation in dorsal horn neurons in normal and spinal nerve-ligated rats. *J Pharmacol Exp Ther* 316:601-607.
- Kawasaki Y, Kumamoto E, Furue H, Yoshimura M (2003) Alpha 2 adrenoceptor-mediated presynaptic inhibition of primary afferent glutamatergic transmission in rat substantia gelatinosa neurons. *Anesthesiology* 98:682-689.

- Keswani SC, Polley M, Pardo CA, Griffin JW, McArthur JC, Hoke A (2003) Schwann cell chemokine receptors mediate HIV-1 gp120 toxicity to sensory neurons. *Ann Neurol* 54:287-296.
- Kieburtz K, Simpson D, Yiannoutsos C, Max MB, Hall CD, Ellis RJ, Marra CM, McKendall R, Singer E, Dal Pan GJ, Clifford DB, Tucker T, Cohen B (1998) A randomized trial of amitriptyline and mexiletine for painful neuropathy in HIV infection. AIDS Clinical Trial Group 242 Protocol Team. *Neurology* 51:1682-1688.
- Kim DS, Lee SJ, Park SY, Yoo HJ, Kim SH, Kim KJ, Cho HJ (2001) Differentially expressed genes in rat dorsal root ganglia following peripheral nerve injury. *Neuroreport* 12:3401-3405.
- Kim KJ, Yoon YW, Chung JM (1997) Comparison of three rodent neuropathic pain models. *Exp Brain Res* 113:200-206.
- Kim SH, Chung JM (1991) Sympathectomy alleviates mechanical allodynia in an experimental animal model for neuropathy in the rat. *Neurosci Lett* 134:131-134.
- Kim SH, Chung JM (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50:355-363.
- Kim SH, Na HS, Sheen K, Chung JM (1993) Effects of sympathectomy on a rat model of peripheral neuropathy. *Pain* 55:85-92.
- Kim SK, Nabekura J (2011) Rapid synaptic remodeling in the adult somatosensory cortex following peripheral nerve injury and its association with neuropathic pain. *J Neurosci* 31:5477-5482.
- King T, Rao S, Vanderah T, Chen Q, Vardanyan A, Porreca F (2006) Differential blockade of nerve injury-induced shift in weight bearing and thermal and tactile hypersensitivity by milnacipran. *J Pain* 7:513-520.
- Kingery WS, Guo TZ, Davies MF, Limbird L, Maze M (2000) The alpha(2A) adrenoceptor and the sympathetic postganglionic neuron contribute to the development of neuropathic heat hyperalgesia in mice. *Pain* 85:345-358.
- Kleinschnitz C, Hofstetter HH, Meuth SG, Braeuninger S, Sommer C, Stoll G (2006) T cell infiltration after chronic constriction injury of mouse sciatic nerve is associated with interleukin-17 expression. *Exp Neurol* 200:480-485.
- Kohn T, Ji RR, Ito N, Allchorne AJ, Befort K, Karchewski LA, Woolf CJ (2005) Peripheral axonal injury results in reduced mu opioid receptor pre- and post-synaptic action in the spinal cord. *Pain* 117:77-87.
- Kolesnikov Y, El-Maarouf A, Rutishauser U, Pasternak G (2007) Reorganization of dorsal root ganglion neurons following chronic sciatic nerve constriction injury: correlation with morphine and lidocaine analgesia. *Eur J Pharmacol* 568:124-133.
- Krell HV, Leuchter AF, Cook IA, Abrams M (2005) Evaluation of reboxetine, a noradrenergic antidepressant, for the treatment of fibromyalgia and chronic low back pain. *Psychosomatics* 46:379-384.
- Krishnadas R, Cavanagh J (2011) Sustained remission of rheumatoid arthritis with a specific serotonin reuptake inhibitor antidepressant: a case report and review of the literature. *J Med Case Reports* 5:112.
- LaGraize SC, Labuda CJ, Rutledge MA, Jackson RL, Fuchs PN (2004) Differential effect of anterior cingulate cortex lesion on mechanical hypersensitivity and escape/avoidance behavior in an animal model of neuropathic pain. *Exp Neurol* 188:139-148.
- Laughlin TM, Vanderah TW, Lashbrook J, Nichols ML, Ossipov M, Porreca F, Wilcox GL (1997) Spinally administered dynorphin A produces long-lasting allodynia: involvement of NMDA but not opioid receptors. *Pain* 72:253-260.

- Lavand'homme P, Pan HL, Eisenach JC (1998) Intrathecal neostigmine, but not sympathectomy, relieves mechanical allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Anesthesiology* 89:493-499.
- Ledeboer A, Gamanos M, Lai W, Martin D, Maier SF, Watkins LR, Quan N (2005) Involvement of spinal cord nuclear factor kappaB activation in rat models of proinflammatory cytokine-mediated pain facilitation. *Eur J Neurosci* 22:1977-1986.
- Ledeboer A, Liu T, Shumilla JA, Mahoney JH, Vijay S, Gross MI, Vargas JA, Sultzbaugh L, Claypool MD, Sanftner LM, Watkins LR, Johnson KW (2006) The glial modulatory drug AV411 attenuates mechanical allodynia in rat models of neuropathic pain. *Neuron Glia Biol* 2:279-291.
- Lee BH, Yoon YW, Chung K, Chung JM (1998) Comparison of sympathetic sprouting in sensory ganglia in three animal models of neuropathic pain. *Exp Brain Res* 120:432-438.
- Lee DH, Katner J, Iyengar S, Lodge D (2001) The effect of lumbar sympathectomy on increased tactile sensitivity in spinal nerve ligated rats. *Neurosci Lett* 298:99-102.
- Lee DH, Chang L, Sorkin LS, Chaplan SR (2005) Hyperpolarization-activated, cation-nonspecific, cyclic nucleotide-modulated channel blockade alleviates mechanical allodynia and suppresses ectopic discharge in spinal nerve ligated rats. *J Pain* 6:417-424.
- Lee YW, Chaplan SR, Yaksh TL (1995) Systemic and supraspinal, but not spinal, opiates suppress allodynia in a rat neuropathic pain model. *Neurosci Lett* 199:111-114.
- Lesch KP, Heils A (2000) Serotonergic gene transcriptional control regions: targets for antidepressant drug development? *Int J Neuropsychopharmacol* 3:67-79.
- Li CY, Song YH, Higuera ES, Luo ZD (2004) Spinal dorsal horn calcium channel alpha2delta-1 subunit upregulation contributes to peripheral nerve injury-induced tactile allodynia. *J Neurosci* 24:8494-8499.
- Li CY, Zhang XL, Matthews EA, Li KW, Kurwa A, Boroujerdi A, Gross J, Gold MS, Dickenson AH, Feng G, Luo ZD (2006) Calcium channel alpha2delta1 subunit mediates spinal hyperexcitability in pain modulation. *Pain* 125:20-34.
- Li JL, Ding YQ, Li YQ, Li JS, Nomura S, Kaneko T, Mizuno N (1998) Immunocytochemical localization of mu-opioid receptor in primary afferent neurons containing substance P or calcitonin gene-related peptide. A light and electron microscope study in the rat. *Brain Res* 794:347-352.
- Light KC, Bragdon EE, Grewen KM, Brownley KA, Girdler SS, Maixner W (2009) Adrenergic dysregulation and pain with and without acute beta-blockade in women with fibromyalgia and temporomandibular disorder. *J Pain* 10:542-552.
- Lin XH, Kashima Y, Khan M, Heller KB, Gu XZ, Sadun AA (1997) An immunohistochemical study of TNF-alpha in optic nerves from AIDS patients. *Curr Eye Res* 16:1064-1068.
- Liu FY, Qu XX, Ding X, Cai J, Jiang H, Wan Y, Han JS, Xing GG (2010) Decrease in the descending inhibitory 5-HT system in rats with spinal nerve ligation. *Brain Res* 1330:45-60.
- Liu X, Eschenfelder S, Blenk KH, Janig W, Habler H (2000) Spontaneous activity of axotomized afferent neurons after L5 spinal nerve injury in rats. *Pain* 84:309-318.
- Loeser JD, Treede RD (2008) The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain* 137:473-477.
- Loh L, Nathan PW (1978) Painful peripheral states and sympathetic blocks. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 41:664-671.

- Lombard MC, Nashold BS, Jr., Albe-Fessard D, Salman N, Sakr C (1979) Deafferentation hypersensitivity in the rat after dorsal rhizotomy: a possible animal model of chronic pain. *Pain* 6:163-174.
- Lopez de Armentia M, Leeson AH, Stebbing MJ, Urban L, McLachlan EM (2003) Responses to sympathomimetics in rat sensory neurones after nerve transection. *Neuroreport* 14:9-13.
- Lynch ME, Clark AJ, Sawynok J, Sullivan MJ (2005) Topical 2% amitriptyline and 1% ketamine in neuropathic pain syndromes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Anesthesiology* 103:140-146.
- Ma W, Eisenach JC (2003) Chronic constriction injury of sciatic nerve induces the up-regulation of descending inhibitory noradrenergic innervation to the lumbar dorsal horn of mice. *Brain Res* 970:110-118.
- Machelska H (2007) Targeting of opioid-producing leukocytes for pain control. *Neuropeptides* 41:355-363.
- Machelska H (2011) Dual peripheral actions of immune cells in neuropathic pain. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 59:11-24.
- Malan TP, Mata HP, Porreca F (2002) Spinal GABA(A) and GABA(B) receptor pharmacology in a rat model of neuropathic pain. *Anesthesiology* 96:1161-1167.
- Malfait AM, Malik AS, Marinova-Mutafchieva L, Butler DM, Maini RN, Feldmann M (1999) The beta2-adrenergic agonist salbutamol is a potent suppressor of established collagen-induced arthritis: mechanisms of action. *J Immunol* 162:6278-6283.
- Malmberg AB, Basbaum AI (1998) Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain* 76:215-222.
- Mansikka H, Zhao C, Sheth RN, Sora I, Uhl G, Raja SN (2004) Nerve injury induces a tonic bilateral mu-opioid receptor-mediated inhibitory effect on mechanical allodynia in mice. *Anesthesiology* 100:912-921.
- Mantyh PW, Rogers SD, Allen CJ, Catton MD, Ghilardi JR, Levin LA, Maggio JE, Vigna SR (1995) Beta 2-adrenergic receptors are expressed by glia in vivo in the normal and injured central nervous system in the rat, rabbit, and human. *J Neurosci* 15:152-164.
- Mao J, Price DD, Mayer DJ (1995) Experimental mononeuropathy reduces the antinociceptive effects of morphine: implications for common intracellular mechanisms involved in morphine tolerance and neuropathic pain. *Pain* 61:353-364.
- Marchand F, Perretti M, McMahon SB (2005) Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 6:521-532.
- Marchand F, Ardid D, Chapuy E, Alloui A, Jourdan D, Eschalier A (2003a) Evidence for an involvement of supraspinal delta- and spinal mu-opioid receptors in the antihyperalgesic effect of chronically administered clomipramine in mononeuropathic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 307:268-274.
- Marchand F, Tsantoulas C, Singh D, Grist J, Clark AK, Bradbury EJ, McMahon SB (2009) Effects of Etanercept and Minocycline in a rat model of spinal cord injury. *Eur J Pain* 13:673-681.
- Marchand F, Alloui A, Chapuy E, Jourdan D, Pelissier T, Ardid D, Hernandez A, Eschalier A (2003b) Evidence for a monoamine mediated, opioid-independent, antihyperalgesic effect of venlafaxine, a non-tricyclic antidepressant, in a neurogenic pain model in rats. *Pain* 103:229-235.
- Marchand F, Pelissier T, Eschalier A, Ardid D, Alloui A, Soto-Moyano R, Mondaca M, Laurido C, Constandil L, Hernandez A (2004) Blockade of supraspinal 5-HT_{1A} receptors potentiates the inhibitory effect of venlafaxine on wind-up activity in mononeuropathic rats. *Brain Res* 1008:288-292.

- Martin TJ, Kim SA, Eisenach JC (2006) Clonidine maintains intrathecal self-administration in rats following spinal nerve ligation. *Pain* 125:257-263.
- Martinez V, Attal N, Bouhassira D, Lantéri-Minet M (2010) Les douleurs neuropathiques chroniques : diagnostic, évaluation et traitement en médecine ambulatoire. Recommandations pour la pratique clinique de la Société française d'étude et de traitement de la douleur. *Douleurs* 11:3-21.
- Maruo K, Yamamoto H, Yamamoto S, Nagata T, Fujikawa H, Kanno T, Yaguchi T, Maruo S, Yoshiya S, Nishizaki T (2006) Modulation of P2X receptors via adrenergic pathways in rat dorsal root ganglion neurons after sciatic nerve injury. *Pain* 120:106-112.
- Matsuda S, Kobayashi N, Terashita T, Shimokawa T, Shigemoto K, Mominoki K, Wakisaka H, Saito S, Miyawaki K, Saito K, Kushihata F, Chen J, Gao SY, Li CY, Wang M, Fujiwara T (2005) Phylogenetic investigation of Dogiel's pericellular nests and Cajal's initial glomeruli in the dorsal root ganglion. *J Comp Neurol* 491:234-245.
- Matsuzawa-Yanagida K, Narita M, Nakajima M, Kuzumaki N, Niikura K, Nozaki H, Takagi T, Tamai E, Hareyama N, Terada M, Yamazaki M, Suzuki T (2008) Usefulness of antidepressants for improving the neuropathic pain-like state and pain-induced anxiety through actions at different brain sites. *Neuropsychopharmacology* 33:1952-1965.
- Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dolle P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP, Kieffer BL (1996) Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 383:819-823.
- Max MB, Lynch SA, Muir J, Shoaf SE, Smoller B, Dubner R (1992) Effects of desipramine, amitriptyline, and fluoxetine on pain in diabetic neuropathy. *N Engl J Med* 326:1250-1256.
- Max MB, Culnane M, Schafer SC, Gracely RH, Walther DJ, Smoller B, Dubner R (1987) Amitriptyline relieves diabetic neuropathy pain in patients with normal or depressed mood. *Neurology* 37:589-596.
- McCahill AC, Huston E, Li X, Houslay MD (2008) PDE4 associates with different scaffolding proteins: modulating interactions as treatment for certain diseases. *Handb Exp Pharmacol*:125-166.
- McCann FE, Palfreeman AC, Andrews M, Perocheau DP, Inglis JJ, Schafer P, Feldmann M, Williams RO, Brennan FM (2010) Apremilast, a novel PDE4 inhibitor, inhibits spontaneous production of tumour necrosis factor-alpha from human rheumatoid synovial cells and ameliorates experimental arthritis. *Arthritis Res Ther* 12:R107.
- McCarson KE, Ralya A, Reisman SA, Enna SJ (2005) Amitriptyline prevents thermal hyperalgesia and modifications in rat spinal cord GABA(B) receptor expression and function in an animal model of neuropathic pain. *Biochem Pharmacol* 71:196-202.
- McCleane G (2000a) Topical application of doxepin hydrochloride, capsaicin and a combination of both produces analgesia in chronic human neuropathic pain: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Clin Pharmacol* 49:574-579.
- McCleane G (2000b) Peripheral antinociceptive actions of desimipramine and fluoxetine in an inflammatory and neuropathic pain test in the rat. *Pain* 85:311-312.
- McDermott AM, Toelle TR, Rowbotham DJ, Schaefer CP, Dukes EM (2006) The burden of neuropathic pain: results from a cross-sectional survey. *Eur J Pain* 10:127-135.
- McGaraughty S, Honore P, Wismer CT, Mikusa J, Zhu CZ, McDonald HA, Bianchi B, Faltynek CR, Jarvis MF (2005) Endogenous opioid mechanisms partially mediate P2X3/P2X2/3-related antinociception in rat models of inflammatory and chemogenic pain but not neuropathic pain. *Br J Pharmacol* 146:180-188.
- McGivern JG (2006) Targeting N-type and T-type calcium channels for the treatment of pain. *Drug Discov Today* 11:245-253.

- McLachlan EM, Janig W, Devor M, Michaelis M (1993) Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia. *Nature* 363:543-546.
- McQuay HJ, Carroll D, Glynn CJ (1992) Low dose amitriptyline in the treatment of chronic pain. *Anaesthesia* 47:646-652.
- McQuay HJ, Tramer M, Nye BA, Carroll D, Wiffen PJ, Moore RA (1996) A systematic review of antidepressants in neuropathic pain. *Pain* 68:217-227.
- Mehler MF, Kessler JA (1995) Cytokines and neuronal differentiation. *Crit Rev Neurobiol* 9:419-446.
- Meier T, Wasner G, Faust M, Kuntzer T, Ochsner F, Hueppe M, Bogousslavsky J, Baron R (2003) Efficacy of lidocaine patch 5% in the treatment of focal peripheral neuropathic pain syndromes: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Pain* 106:151-158.
- Melzack R, Casey K (1968) Sensory, motivational, and central control determinants of pain: a new conceptual model. In: *The skin senses* (D. K, ed): Springfield.
- Menkes DB, Fawcett JP, Busch AF, Jones D (1995) Moclobemide in chronic neuropathic pain: preliminary case reports. *Clin J Pain* 11:134-138.
- Mennicken F, Zhang J, Hoffert C, Ahmad S, Beaudet A, O'Donnell D (2003) Phylogenetic changes in the expression of delta opioid receptors in spinal cord and dorsal root ganglia. *J Comp Neurol* 465:349-360.
- Merrill DP, Martinez-Picado J, Tremblay C, Sax PE, Boswell SL, Wong JT, D'Aquila RT, Walker BD, Hirsch MS (1999) Improved CD4 lymphocyte outgrowth in response to effective antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 179:345-351.
- Merrill JE, Chen IS (1991) HIV-1, macrophages, glial cells, and cytokines in AIDS nervous system disease. *FASEB J* 5:2391-2397.
- Merskey H, Bogduk N (1994) Classification of chronic pain : descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms, Second Edition. Seattle: IASP press.
- Meunier A, Latremoliere A, Dominguez E, Mauborgne A, Philippe S, Hamon M, Mallet J, Benoliel JJ, Pohl M (2007) Lentiviral-mediated targeted NF-kappaB blockade in dorsal spinal cord glia attenuates sciatic nerve injury-induced neuropathic pain in the rat. *Mol Ther* 15:687-697.
- Michaelis M, Liu X, Janig W (2000) Axotomized and intact muscle afferents but no skin afferents develop ongoing discharges of dorsal root ganglion origin after peripheral nerve lesion. *J Neurosci* 20:2742-2748.
- Mico JA, Ardid D, Berrocoso E, Eschalier A (2006) Antidepressants and pain. *Trends Pharmacol Sci* 27:348-354.
- Mico JA, Gibert-Rahola J, Casas J, Rojas O, Serrano MI, Serrano JS (1997) Implication of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in the antinociceptive effect of tricyclic antidepressants. *Eur Neuropsychopharmacol* 7:139-145.
- Mika J, Przewlocki R, Przewlocka B (2001) The role of delta-opioid receptor subtypes in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 415:31-37.
- Mika J, Rojewska E, Makuch W, Przewlocka B (2010) Minocycline reduces the injury-induced expression of prodynorphin and pronociceptin in the dorsal root ganglion in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience* 165:1420-1428.
- 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.
- Minami M, Maekawa K, Yabuuchi K, Satoh M (1995) Double in situ hybridization study on coexistence of mu-, delta- and kappa-opioid receptor mRNAs with preprotachykinin A mRNA in the rat dorsal root ganglia. *Brain Res Mol Brain Res* 30:203-210.
- Moalem G, Tracey DJ (2006) Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res Rev* 51:240-264.

- Mogil JS, Grisel JE, Hayward MD, Bales JR, Rubinstein M, Belknap JK, Low MJ (2000) Disparate spinal and supraspinal opioid antinociceptive responses in beta-endorphin-deficient mutant mice. *Neuroscience* 101:709-717.
- Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H, Woolf CJ (2002) Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci* 22:6724-6731.
- Mosconi T, Kruger L (1996) Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy: ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations. *Pain* 64:37-57.
- Moulin DE et al. (2007) Pharmacological management of chronic neuropathic pain - consensus statement and guidelines from the Canadian Pain Society. *Pain Res Manag* 12:13-21.
- Mousa SA, Zhang Q, Sitte N, Ji R, Stein C (2001) beta-Endorphin-containing memory-cells and mu-opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue. *J Neuroimmunol* 115:71-78.
- Muller A (1996) Physiologie, neurochimie et plasticité des voies nociceptives. In: *Anesthésie locorégionale et traitement de la douleur*, pp 433-468. Paris: Masson.
- Murata Y, Olmarker K, Takahashi I, Takahashi K, Rydevik B (2006) Effects of lumbar sympathectomy on pain behavioral changes caused by nucleus pulposus-induced spinal nerve damage in rats. *Eur Spine J* 15:634-640.
- Murray JB (2000) Cardiac disorders and antidepressant medications. *J Psychol* 134:162-168.
- Myers RR, Campana WM, Shubayev VI (2006) The role of neuroinflammation in neuropathic pain: mechanisms and therapeutic targets. *Drug Discov Today* 11:8-20.
- Nackley AG, Tan KS, Fecho K, Flood P, Diatchenko L, Maixner W (2007) Catechol-O-methyltransferase inhibition increases pain sensitivity through activation of both beta2- and beta3-adrenergic receptors. *Pain* 128:199-208.
- Nadal X, Banos JE, Kieffer BL, Maldonado R (2006) Neuropathic pain is enhanced in delta-opioid receptor knockout mice. *Eur J Neurosci* 23:830-834.
- Nagano I, Shapshak P, Yoshioka M, Xin K, Nakamura S, Bradley WG (1996) Increased NADPH-diaphorase reactivity and cytokine expression in dorsal root ganglia in acquired immunodeficiency syndrome. *J Neurol Sci* 136:117-128.
- Nagasako EM, Oaklander AL, Dworkin RH (2003) Congenital insensitivity to pain: an update. *Pain* 101:213-219.
- Nassar MA, Levato A, Stirling LC, Wood JN (2005) Neuropathic pain develops normally in mice lacking both Na(v)1.7 and Na(v)1.8. *Mol Pain* 1:24.
- Nassar MA, Baker MD, Levato A, Ingram R, Mallucci G, McMahon SB, Wood JN (2006) Nerve injury induces robust allodynia and ectopic discharges in Nav1.3 null mutant mice. *Mol Pain* 2:33.
- Neil A, Attal N, Guilbaud G (1991) Effects of guanethidine on sensitization to natural stimuli and self-mutilating behaviour in rats with a peripheral neuropathy. *Brain Res* 565:237-246.
- Newton RA, Bingham S, Case PC, Sanger GJ, Lawson SN (2001) Dorsal root ganglion neurons show increased expression of the calcium channel alpha2delta-1 subunit following partial sciatic nerve injury. *Brain Res Mol Brain Res* 95:1-8.
- Nicholson B, Verma S (2004) Comorbidities in chronic neuropathic pain. *Pain Med* 5 Suppl 1:S9-S27.
- Norenberg MD, Smith J, Marcillo A (2004) The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. *J Neurotrauma* 21:429-440.

- Nozaki C, Kamei J (2006) Possible involvement of opioidergic systems in the antinociceptive effect of the selective serotonin reuptake inhibitors in sciatic nerve-injured mice. *Eur J Pharmacol* 552:99-104.
- Nunez A, Amzica F, Steriade M (1993) Electrophysiology of cat association cortical cells in vivo: intrinsic properties and synaptic responses. *J Neurophysiol* 70:418-430.
- Nyland H, Matre R, Mork S (1981) Immunological characterization of sural nerve biopsies from patients with Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol* 9 Suppl:80-86.
- Nystrom B, Hagbarth KE (1981) Microelectrode recordings from transected nerves in amputees with phantom limb pain. *Neurosci Lett* 27:211-216.
- Obara I, Mika J, Schafer MK, Przewlocka B (2003) Antagonists of the kappa-opioid receptor enhance allodynia in rats and mice after sciatic nerve ligation. *Br J Pharmacol* 140:538-546.
- Obara I, Makuch W, Spetea M, Schutz J, Schmidhammer H, Przewlocki R, Przewlocka B (2007) Local peripheral antinociceptive effects of 14-O-methyloxymorphone derivatives in inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Eur J Pharmacol* 558:60-67.
- Obata H, Saito S, Koizuka S, Nishikawa K, Goto F (2005) The monoamine-mediated antiallodynic effects of intrathecally administered milnacipran, a serotonin noradrenaline reuptake inhibitor, in a rat model of neuropathic pain. *Anesth Analg* 100:1406-1410, table of contents.
- Obata H, Kimura M, Nakajima K, Tobe M, Nishikawa K, Saito S (2010) Monoamine-dependent, opioid-independent antihypersensitivity effects of intrathecally administered milnacipran, a serotonin noradrenaline reuptake inhibitor, in a postoperative pain model in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 334:1059-1065.
- Onal A, Parlar A, Ulker S (2007) Milnacipran attenuates hyperalgesia and potentiates antihyperalgesic effect of tramadol in rats with mononeuropathic pain. *Pharmacol Biochem Behav* 88:171-178.
- Oneal BJ, Patterson DR, Soltani M, Teeley A, Jensen MP (2008) Virtual reality hypnosis in the treatment of chronic neuropathic pain: a case report. *Int J Clin Exp Hypn* 56:451-462.
- Onghena P, Van Houdenhove B (1992) Antidepressant-induced analgesia in chronic non-malignant pain: a meta-analysis of 39 placebo-controlled studies. *Pain* 49:205-219.
- Osborn L, Kunkel S, Nabel GJ (1989) Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2336-2340.
- Ossipov MH, Hong Sun T, Malan P, Jr., Lai J, Porreca F (2000) Mediation of spinal nerve injury induced tactile allodynia by descending facilitatory pathways in the dorsolateral funiculus in rats. *Neurosci Lett* 290:129-132.
- Ozdogan UK, Lahdesmaki J, Mansikka H, Scheinin M (2004) Loss of amitriptyline analgesia in alpha 2A-adrenoceptor deficient mice. *Eur J Pharmacol* 485:193-196.
- Paleckova V, Palecek J, McAdoo DJ, Willis WD (1992) The non-NMDA antagonist CNQX prevents release of amino acids into the rat spinal cord dorsal horn evoked by sciatic nerve stimulation. *Neurosci Lett* 148:19-22.
- Pan HL, Wu ZZ, Zhou HY, Chen SR, Zhang HM, Li DP (2008) Modulation of pain transmission by G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 117:141-161.
- Pancrazio JJ, Kamatchi GL, Roscoe AK, Lynch C, 3rd (1998) Inhibition of neuronal Na⁺ channels by antidepressant drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 284:208-214.
- Panerai AE, Sacerdote P, Brini A, Bianchi M, Mantegazza P (1987) Autotomy and central nervous system neuropeptides after section of the sciatic nerve in rats of different strains. *Pharmacol Biochem Behav* 28:385-388.

- Paoli F, Darcourt G, Cossa P (1960) [Preliminary note on the action of imipramine in painful states]. *Rev Neurol (Paris)* 102:503-504.
- Paqueron X, Conklin D, Eisenach JC (2003) Plasticity in action of intrathecal clonidine to mechanical but not thermal nociception after peripheral nerve injury. *Anesthesiology* 99:199-204.
- Pardo CA, McArthur JC, Griffin JW (2001) HIV neuropathy: insights in the pathology of HIV peripheral nerve disease. *J Peripher Nerv Syst* 6:21-27.
- Paulson PE, Morrow TJ, Casey KL (2000) Bilateral behavioral and regional cerebral blood flow changes during painful peripheral mononeuropathy in the rat. *Pain* 84:233-245.
- Paulson PE, Casey KL, Morrow TJ (2002) Long-term changes in behavior and regional cerebral blood flow associated with painful peripheral mononeuropathy in the rat. *Pain* 95:31-40.
- Peng XM, Zhou ZG, Glorioso JC, Fink DJ, Mata M (2006) Tumor necrosis factor- α contributes to below-level neuropathic pain after spinal cord injury. *Ann Neurol* 59:843-851.
- Pertin M, Allchorne AJ, Beggah AT, Woolf CJ, Decosterd I (2007) Delayed sympathetic dependence in the spared nerve injury (SNI) model of neuropathic pain. *Mol Pain* 3:21.
- Pertovaara A, Kauppi T (1989) Effect of chronic sciatic nerve section on saphenous nerve input to midline bulboreticular formation in the rat. *Neurosci Lett* 105:68-72.
- Petersen M, Zhang J, Zhang JM, LaMotte RH (1996) Abnormal spontaneous activity and responses to norepinephrine in dissociated dorsal root ganglion cells after chronic nerve constriction. *Pain* 67:391-397.
- Petrillo P, Angelici O, Bingham S, Ficalora G, Garnier M, Zaratini PF, Petrone G, Pozzi O, Sbacchi M, Stean TO, Upton N, Dondio GM, Scheideler MA (2003) Evidence for a selective role of the delta-opioid agonist [8R-(4bS*,8a α ,8a β , 12b β)]7,10-Dimethyl-1-methoxy-11-(2-methylpropyl)oxycarbonyl 5,6,7,8,12,12b-hexahydro-(9H)-4,8-methanobenzofuro[3,2-e]pyrrolo[2,3-g]iso quinoline hydrochloride (SB-235863) in blocking hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain responses. *J Pharmacol Exp Ther* 307:1079-1089.
- Peyron R, Garcia-Larrea L, Deiber MP, Cinotti L, Convers P, Sindou M, Mauguier F, Laurent B (1995) Electrical stimulation of precentral cortical area in the treatment of central pain: electrophysiological and PET study. *Pain* 62:275-286.
- Peyron R, Garcia-Larrea L, Gregoire MC, Convers P, Richard A, Lavenne F, Barral FG, Mauguier F, Michel D, Laurent B (2000) Parietal and cingulate processes in central pain. A combined positron emission tomography (PET) and functional magnetic resonance imaging (fMRI) study of an unusual case. *Pain* 84:77-87.
- Pichon X, Wattiez AS, Becamel C, Ehrlich I, Bockaert J, Eschalier A, Marin P, Courteix C (2010) Disrupting 5-HT(2A) receptor/PDZ protein interactions reduces hyperalgesia and enhances SSRI efficacy in neuropathic pain. *Mol Ther* 18:1462-1470.
- Pinto V, Derkach VA, Safronov BV (2008) Role of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium channels in A δ - and C-fiber conduction and synaptic transmission. *J Neurophysiol* 99:617-628.
- Pohl M, Collin E, Bourgoin S, Conrath M, Benoliel JJ, Nevo I, Hamon M, Giraud P, Cesselin F (1994) Expression of preproenkephalin A gene and presence of Met-enkephalin in dorsal root ganglia of the adult rat. *J Neurochem* 63:1226-1234.
- Polgar E, Todd AJ (2008) Tactile allodynia can occur in the spared nerve injury model in the rat without selective loss of GABA or GABA(A) receptors from synapses in laminae I-II of the ipsilateral spinal dorsal horn. *Neuroscience* 156:193-202.

- Polgar E, Hughes DI, Arham AZ, Todd AJ (2005) Loss of neurons from laminae I-III of the spinal dorsal horn is not required for development of tactile allodynia in the spared nerve injury model of neuropathic pain. *J Neurosci* 25:6658-6666.
- Portenoy RK, Foley KM, Inturrisi CE (1990) The nature of opioid responsiveness and its implications for neuropathic pain: new hypotheses derived from studies of opioid infusions. *Pain* 43:273-286.
- Punke MA, Friederich P (2007) Amitriptyline is a potent blocker of human Kv1.1 and Kv7.2/7.3 channels. *Anesth Analg* 104:1256-1264, tables of contents.
- Qu C, King T, Okun A, Lai J, Fields HL, Porreca F (2011) Lesion of the rostral anterior cingulate cortex eliminates the aversiveness of spontaneous neuropathic pain following partial or complete axotomy. *Pain* 152:1641-1648.
- Raja SN (1998) Peripheral modulatory effects of catecholamines in inflammatory and neuropathic pain. *Adv Pharmacol* 42:567-571.
- Raja SN, Treede RD, Davis KD, Campbell JN (1991) Systemic alpha-adrenergic blockade with phentolamine: a diagnostic test for sympathetically maintained pain. *Anesthesiology* 74:691-698.
- Ramer MS, Bisby MA (1997) Rapid sprouting of sympathetic axons in dorsal root ganglia of rats with a chronic constriction injury. *Pain* 70:237-244.
- Ramer MS, Bisby MA (1998) Differences in sympathetic innervation of mouse DRG following proximal or distal nerve lesions. *Exp Neurol* 152:197-207.
- Ramer MS, Bisby MA (1999) Adrenergic innervation of rat sensory ganglia following proximal or distal painful sciatic neuropathy: distinct mechanisms revealed by anti-NGF treatment. *Eur J Neurosci* 11:837-846.
- Ramer MS, French GD, Bisby MA (1997) Wallerian degeneration is required for both neuropathic pain and sympathetic sprouting into the DRG. *Pain* 72:71-78.
- Ramer MS, Murphy PG, Richardson PM, Bisby MA (1998a) Spinal nerve lesion-induced mechanoallodynia and adrenergic sprouting in sensory ganglia are attenuated in interleukin-6 knockout mice. *Pain* 78:115-121.
- Ramer MS, Kawaja MD, Henderson JT, Roder JC, Bisby MA (1998b) Glial overexpression of NGF enhances neuropathic pain and adrenergic sprouting into DRG following chronic sciatic constriction in mice. *Neurosci Lett* 251:53-56.
- Rashid MH, Ueda H (2002) Neuropathy-specific analgesic action of intrathecal nicotinic agonists and its spinal GABA-mediated mechanism. *Brain Res* 953:53-62.
- Rashid MH, Inoue M, Toda K, Ueda H (2004) Loss of peripheral morphine analgesia contributes to the reduced effectiveness of systemic morphine in neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 309:380-387.
- Rau KK, Caudle RM, Cooper BY, Johnson RD (2005) Diverse immunocytochemical expression of opioid receptors in electrophysiologically defined cells of rat dorsal root ganglia. *J Chem Neuroanat* 29:255-264.
- Ren K, Dubner R (2008) Neuron-glia crosstalk gets serious: role in pain hypersensitivity. *Curr Opin Anaesthesiol* 21:570-579.
- Ren K, Dubner R (2010) Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nat Med* 16:1267-1276.
- Reynolds JL, Ignatowski TA, Sud R, Spengler RN (2005) An antidepressant mechanism of desipramine is to decrease tumor necrosis factor-alpha production culminating in increases in noradrenergic neurotransmission. *Neuroscience* 133:519-531.
- Rezai AR, Lozano AM, Crawley AP, Joy ML, Davis KD, Kwan CL, Dostrovsky JO, Tasker RR, Mikulis DJ (1999) Thalamic stimulation and functional magnetic resonance imaging: localization of cortical and subcortical activation with implanted electrodes. Technical note. *J Neurosurg* 90:583-590.

- Ringkamp M, Eschenfelder S, Grethel EJ, Habler HJ, Meyer RA, Janig W, Raja SN (1999) Lumbar sympathectomy failed to reverse mechanical allodynia- and hyperalgesia-like behavior in rats with L5 spinal nerve injury. *Pain* 79:143-153.
- Rintala DH, Holmes SA, Courtade D, Fiess RN, Tastard LV, Loubser PG (2007) Comparison of the effectiveness of amitriptyline and gabapentin on chronic neuropathic pain in persons with spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 88:1547-1560.
- Rivat C, Becker C, Blugeot A, Zeau B, Mauborgne A, Pohl M, Benoliel JJ (2010) Chronic stress induces transient spinal neuroinflammation, triggering sensory hypersensitivity and long-lasting anxiety-induced hyperalgesia. *Pain* 150:358-368.
- Rongione AJ, Kusske AM, Ashley SW, Reber HA, McFadden DW (1997) Interleukin-10 prevents early cytokine release in severe intraabdominal infection and sepsis. *J Surg Res* 70:107-112.
- Rowbotham MC, Reisner-Keller LA, Fields HL (1991) Both intravenous lidocaine and morphine reduce the pain of postherpetic neuralgia. *Neurology* 41:1024-1028.
- Rowbotham MC, Twilling L, Davies PS, Reisner L, Taylor K, Mohr D (2003) Oral opioid therapy for chronic peripheral and central neuropathic pain. *N Engl J Med* 348:1223-1232.
- Roza C, Laird JM, Souslova V, Wood JN, Cervero F (2003) The tetrodotoxin-resistant Na⁺ channel Nav1.8 is essential for the expression of spontaneous activity in damaged sensory axons of mice. *J Physiol* 550:921-926.
- Ruffolo R, Fuerstein G, Hunter A, Poste G, Metcalf B (1999) Inflammatory cells and mediators in CNS diseases. Netherlands: Harwood Academic.
- Saadati HG, Khan IA, Lin XH, Kadakia AB, Heller KB, Sadun AA (1999) Immunolocalization of IL-1 β and IL-6 in optic nerves of patients with AIDS. *Curr Eye Res* 19:264-268.
- Saarto T, Wiffen PJ (2005) Antidepressants for neuropathic pain. *Cochrane Database Syst Rev*:CD005454.
- Saarto T, Wiffen PJ (2007) Antidepressants for neuropathic pain. *Cochrane Database Syst Rev*:CD005454.
- Saarto T, Wiffen PJ (2010) Antidepressants for neuropathic pain: a Cochrane review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81:1372-1373.
- Sacre S, Medghalchi M, Gregory B, Brennan F, Williams R (2010) Fluoxetine and citalopram exhibit potent antiinflammatory activity in human and murine models of rheumatoid arthritis and inhibit toll-like receptors. *Arthritis Rheum* 62:683-693.
- Saegusa H, Kurihara T, Zong S, Kazuno A, Matsuda Y, Nonaka T, Han W, Toriyama H, Tanabe T (2001) Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca²⁺ channel. *EMBO J* 20:2349-2356.
- Sanchez AJ, Puerta C, Ballester S, Gonzalez P, Arriaga A, Garcia-Merino A (2005) Rolipram impairs NF-kappaB activity and MMP-9 expression in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 168:13-20.
- Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Lanata L, Bagnasco M, Colombo M, Fischer F, D'Improrano M (2010) Pain and ketoprofen: what is its role in clinical practice? *Reumatismo* 62:172-188.
- Sato J, Perl ER (1991) Adrenergic excitation of cutaneous pain receptors induced by peripheral nerve injury. *Science* 251:1608-1610.
- Satoh O, Omote K (1996) Roles of monoaminergic, glycinergic and GABAergic inhibitory systems in the spinal cord in rats with peripheral mononeuropathy. *Brain Res* 728:27-36.
- Sawynok J, Reid A (2003) Peripheral interactions between dextromethorphan, ketamine and amitriptyline on formalin-evoked behaviors and paw edema in rats. *Pain* 102:179-186.

- Sawynok J, Esser MJ, Reid AR (1999) Peripheral antinociceptive actions of desipramine and fluoxetine in an inflammatory and neuropathic pain test in the rat. *Pain* 82:149-158.
- Sawynok J, Reid AR, Fredholm BB (2008) Caffeine reverses antinociception by amitriptyline in wild type mice but not in those lacking adenosine A1 receptors. *Neurosci Lett* 440:181-184.
- Schafers M, Svensson CI, Sommer C, Sorkin LS (2003) Tumor necrosis factor-alpha induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons. *J Neurosci* 23:2517-2521.
- Schafers M, Sommer C, Geis C, Hagenacker T, Vandenabeele P, Sorkin LS (2008) Selective stimulation of either tumor necrosis factor receptor differentially induces pain behavior in vivo and ectopic activity in sensory neurons in vitro. *Neuroscience* 157:414-423.
- Scherrer G, Imamachi N, Cao YQ, Contet C, Mennicken F, O'Donnell D, Kieffer BL, Basbaum AI (2009) Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. *Cell* 137:1148-1159.
- Schifitto G, McDermott MP, McArthur JC, Marder K, Sacktor N, Epstein L, Kiebertz K (2002) Incidence of and risk factors for HIV-associated distal sensory polyneuropathy. *Neurology* 58:1764-1768.
- Schlesinger EB (1991) Alfred Reginald Allen: the mythic career of a gifted neuroscientist. *Surg Neurol* 36:229-233.
- Scholz J, Woolf CJ (2002) Can we conquer pain? *Nat Neurosci* 5 Suppl:1062-1067.
- Scholz J, Woolf CJ (2007) The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci* 10:1361-1368.
- Scholz J, Broom DC, Youn DH, Mills CD, Kohno T, Suter MR, Moore KA, Decosterd I, Coggeshall RE, Woolf CJ (2005) Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 25:7317-7323.
- Schreiber S, Backer MM, Herman I, Shamir D, Boniel T, Pick CG (2000) The antinociceptive effect of trazodone in mice is mediated through both mu-opioid and serotonergic mechanisms. *Behav Brain Res* 114:51-56.
- Sehgal N, Smith HS, Manchikanti L (2011) Peripherally acting opioids and clinical implications for pain control. *Pain Physician* 14:249-258.
- Sekiguchi M, Kobayashi H, Sekiguchi Y, Konno S, Kikuchi S (2008) Sympathectomy reduces mechanical allodynia, tumor necrosis factor-alpha expression, and dorsal root ganglion apoptosis following nerve root crush injury. *Spine (Phila Pa 1976)* 33:1163-1169.
- Selmeczy Z, Szelenyi J, Vizi ES (2003) Intact noradrenaline transporter is needed for the sympathetic fine-tuning of cytokine balance. *Eur J Pharmacol* 469:175-181.
- Seltzer Z, Dubner R, Shir Y (1990) A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43:205-218.
- Sfikakis PP (2010) The first decade of biologic TNF antagonists in clinical practice: lessons learned, unresolved issues and future directions. *Curr Dir Autoimmun* 11:180-210.
- Sharer LR, Saito Y, Epstein LG, Blumberg BM (1994) Detection of HIV-1 DNA in pediatric AIDS brain tissue by two-step ISPCR. *Adv Neuroimmunol* 4:283-285.
- Sheets PL, Heers C, Stoehr T, Cummins TR (2008) Differential block of sensory neuronal voltage-gated sodium channels by lacosamide [(2R)-2-(acetylamino)-N-benzyl-3-methoxypropanamide], lidocaine, and carbamazepine. *J Pharmacol Exp Ther* 326:89-99.
- Shinder V, Devor M (1994) Structural basis of neuron-to-neuron cross-excitation in dorsal root ganglia. *J Neurocytol* 23:515-531.

- Shinder V, Govrin-Lippmann R, Cohen S, Belenky M, Ilin P, Fried K, Wilkinson HA, Devor M (1999) Structural basis of sympathetic-sensory coupling in rat and human dorsal root ganglia following peripheral nerve injury. *J Neurocytol* 28:743-761.
- Shir Y, Seltzer Z (1991) Effects of sympathectomy in a model of causalgiform pain produced by partial sciatic nerve injury in rats. *Pain* 45:309-320.
- Shlay JC, Chaloner K, Max MB, Flaws B, Reichelderfer P, Wentworth D, Hillman S, Brizz B, Cohn DL (1998) Acupuncture and amitriptyline for pain due to HIV-related peripheral neuropathy: a randomized controlled trial. Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. *JAMA* 280:1590-1595.
- Shubayev VI, Angert M, Dolkas J, Campana WM, Palenscar K, Myers RR (2006) TNFalpha-induced MMP-9 promotes macrophage recruitment into injured peripheral nerve. *Mol Cell Neurosci* 31:407-415.
- Siddall PJ, Gray M, Rutkowski S, Cousins MJ (1994) Intrathecal morphine and clonidine in the management of spinal cord injury pain: a case report. *Pain* 59:147-148.
- Silva LC, Ortigosa LC, Benard G (2010) Anti-TNF-alpha agents in the treatment of immune-mediated inflammatory diseases: mechanisms of action and pitfalls. *Immunotherapy* 2:817-833.
- Simonin F, Valverde O, Smadja C, Slowe S, Kitchen I, Dierich A, Le Meur M, Roques BP, Maldonado R, Kieffer BL (1998) Disruption of the kappa-opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective kappa-agonist U-50,488H and attenuates morphine withdrawal. *EMBO J* 17:886-897.
- Sindrup SH, Jensen TS (1999) Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: an update and effect related to mechanism of drug action. *Pain* 83:389-400.
- Sindrup SH, Brosen K, Gram LF (1992) Antidepressants in pain treatment: antidepressant or analgesic effect? *Clin Neuropharmacol* 15 Suppl 1 Pt A:636A-637A.
- Sindrup SH, Otto M, Finnerup NB, Jensen TS (2005) Antidepressants in the treatment of neuropathic pain. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 96:399-409.
- Sindrup SH, Gram LF, Skjold T, Froland A, Beck-Nielsen H (1990) Concentration-response relationship in imipramine treatment of diabetic neuropathy symptoms. *Clin Pharmacol Ther* 47:509-515.
- Sindrup SH, Bach FW, Madsen C, Gram LF, Jensen TS (2003) Venlafaxine versus imipramine in painful polyneuropathy: a randomized, controlled trial. *Neurology* 60:1284-1289.
- Sleeper AA, Cummins TR, Dib-Hajj SD, Hormuzdiar W, Tyrrell L, Waxman SG, Black JA (2000) Changes in expression of two tetrodotoxin-resistant sodium channels and their currents in dorsal root ganglion neurons after sciatic nerve injury but not rhizotomy. *J Neurosci* 20:7279-7289.
- Sommer C, Schafers M, Marziniak M, Toyka KV (2001) Etanercept reduces hyperalgesia in experimental painful neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 6:67-72.
- Song Z, Ultenius C, Meyerson BA, Linderöth B (2009) Pain relief by spinal cord stimulation involves serotonergic mechanisms: an experimental study in a rat model of mononeuropathy. *Pain* 147:241-248.
- Spiegel K, Kalb R, Pasternak GW (1983) Analgesic activity of tricyclic antidepressants. *Ann Neurol* 13:462-465.
- Stanton-Hicks M, Janig W, Hassenbusch S, Haddox JD, Boas R, Wilson P (1995) Reflex sympathetic dystrophy: changing concepts and taxonomy. *Pain* 63:127-133.
- Stein C, Zollner C (2009) Opioids and sensory nerves. *Handb Exp Pharmacol*:495-518.

- Stevens CW, Kajander KC, Bennett GJ, Seybold VS (1991) Bilateral and differential changes in spinal mu, delta and kappa opioid binding in rats with a painful, unilateral neuropathy. *Pain* 46:315-326.
- Stone LS, Vulchanova L, Riedl MS, Williams FG, Wilcox GL, Elde R (2004) Effects of peripheral nerve injury on delta opioid receptor (DOR) immunoreactivity in the rat spinal cord. *Neurosci Lett* 361:208-211.
- Stremmel C, Horn C, Eder S, Dimmler A, Lang W (2005) The impact of immunological parameters on the development of phantom pain after major amputation. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 30:79-82.
- Sud R, Spengler RN, Nader ND, Ignatowski TA (2008) Antinociception occurs with a reversal in alpha 2-adrenoceptor regulation of TNF production by peripheral monocytes/macrophages from pro- to anti-inflammatory. *Eur J Pharmacol* 588:217-231.
- Sugimoto T, Takemura M, Sakai A, Ishimaru M (1987) Rapid transneuronal destruction following peripheral nerve transection in the medullary dorsal horn is enhanced by strychnine, picrotoxin and bicuculline. *Pain* 30:385-393.
- Sung B, Loh HH, Wei L (2000) Association of kappa opioid receptor mRNA upregulation in dorsal root ganglia with mechanical allodynia in mice following nerve injury. *Neurosci Lett* 291:163-166.
- Sussman C (2008) Preventing and modulating learned wound pain. *Ostomy Wound Manage* 54:38-47.
- Sutçigil L, Oktenli C, Musabak U, Bozkurt A, Cansever A, Uzun O, Sanisoglu SY, Yesilova Z, Ozmenler N, Ozsahin A, Sengul A (2007) Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in major depression: effect of sertraline therapy. *Clin Dev Immunol* 2007:76396.
- Suzuki R, Rygh LJ, Dickenson AH (2004) Bad news from the brain: descending 5-HT pathways that control spinal pain processing. *Trends Pharmacol Sci* 25:613-617.
- Suzuki T, Ueta K, Tamagaki S, Mashimo T (2008) Antiallodynic and antihyperalgesic effect of milnacipran in mice with spinal nerve ligation. *Anesth Analg* 106:1309-1315, table of contents.
- Suzuki Y, Goto K, Shiizaki K, Omiya Y, Ishige A, Komatsu Y, Kamei J (2001) Antinociceptive effect of U-50488H, a kappa-opioid agonist, in streptozotocin-induced diabetic mice. *J Pharm Pharmacol* 53:521-526.
- Taiwo YO, Bjerknes LK, Goetzl EJ, Levine JD (1989) Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. *Neuroscience* 32:577-580.
- Takahashi N, Tetsuka T, Uranishi H, Okamoto T (2002) Inhibition of the NF-kappaB transcriptional activity by protein kinase A. *Eur J Biochem* 269:4559-4565.
- Takeda R, Watanabe Y, Ikeda T, Abe H, Ebihara K, Matsuo H, Nonaka H, Hashiguchi H, Nishimori T, Ishida Y (2009) Analgesic effect of milnacipran is associated with c-Fos expression in the anterior cingulate cortex in the rat neuropathic pain model. *Neurosci Res* 64:380-384.
- Tasmuth T, Hartel B, Kalso E (2002) Venlafaxine in neuropathic pain following treatment of breast cancer. *Eur J Pain* 6:17-24.
- Thacker MA, Clark AK, Marchand F, McMahon SB (2007) Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules. *Anesth Analg* 105:838-847.
- Tomiyama M, Furusawa K, Kamijo M, Kimura T, Matsunaga M, Baba M (2005) Upregulation of mRNAs coding for AMPA and NMDA receptor subunits and metabotropic glutamate receptors in the dorsal horn of the spinal cord in a rat model of diabetes mellitus. *Brain Res Mol Brain Res* 136:275-281.

- Tracey DJ, Cunningham JE, Romm MA (1995) Peripheral hyperalgesia in experimental neuropathy: mediation by alpha 2-adrenoreceptors on post-ganglionic sympathetic terminals. *Pain* 60:317-327.
- Truong W, Cheng C, Xu QG, Li XQ, Zochodne DW (2003) Mu opioid receptors and analgesia at the site of a peripheral nerve injury. *Ann Neurol* 53:366-375.
- Uceyler N, Sommer C (2008) Cytokine regulation in animal models of neuropathic pain and in human diseases. *Neurosci Lett* 437:194-198.
- Ulugol A, Karadag HC, Tamer M, Firat Z, Aslantas A, Dokmeci I (2002) Involvement of adenosine in the anti-allodynic effect of amitriptyline in streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurosci Lett* 328:129-132.
- Valaskatgis P, Macklin EA, Schachter SC, Wayne PM (2008) Possible effects of acupuncture on atrial fibrillation and post-herpetic neuralgia--a case report. *Acupunct Med* 26:51-56.
- Vale ML, Cunha FQ, Brito GA, Benevides VM, Ferreira SH, Poole S, Ribeiro RA (2006) Anti-nociceptive effect of thalidomide on zymosan-induced experimental articular incapacitation. *Eur J Pharmacol* 536:309-317.
- Vallejo R, Tilley DM, Vogel L, Benyamin R (2010) The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. *Pain Pract* 10:167-184.
- Valverde O, Mico JA, Maldonado R, Mellado M, Gibert-Rahola J (1994) Participation of opioid and monoaminergic mechanisms on the antinociceptive effect induced by tricyclic antidepressants in two behavioural pain tests in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 18:1073-1092.
- Vanderah TW, Laughlin T, Lashbrook JM, Nichols ML, Wilcox GL, Ossipov MH, Malan TP, Jr., Porreca F (1996) Single intrathecal injections of dynorphin A or des-Tyr-dynorphins produce long-lasting allodynia in rats: blockade by MK-801 but not naloxone. *Pain* 68:275-281.
- Vera-Portocarrero LP, Zhang ET, Ossipov MH, Xie JY, King T, Lai J, Porreca F (2006) Descending facilitation from the rostral ventromedial medulla maintains nerve injury-induced central sensitization. *Neuroscience* 140:1311-1320.
- Vogel C, Mossner R, Gerlach M, Heinemann T, Murphy DL, Riederer P, Lesch KP, Sommer C (2003) Absence of thermal hyperalgesia in serotonin transporter-deficient mice. *J Neurosci* 23:708-715.
- von Kugelgen I, Allgaier C, Schobert A, Starke K (1994) Co-release of noradrenaline and ATP from cultured sympathetic neurons. *Neuroscience* 61:199-202.
- Vos BP, Benoist JM, Gautron M, Guilbaud G (2000) Changes in neuronal activities in the two ventral posterior medial thalamic nuclei in an experimental model of trigeminal pain in the rat by constriction of one infraorbital nerve. *Somatosens Mot Res* 17:109-122.
- Voscopoulos C, Lema M (2010) When does acute pain become chronic? *Br J Anaesth* 105 Suppl 1:i69-85.
- Vranken JH, Hollmann MW, van der Vegt MH, Kruis MR, Heesen M, Vos K, Pijl AJ, Dijkgraaf MG (2011) Duloxetine in patients with central neuropathic pain caused by spinal cord injury or stroke: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pain* 152:267-273.
- Vrethem M, Boivie J, Arnqvist H, Holmgren H, Lindstrom T, Thorell LH (1997) A comparison of amitriptyline and maprotiline in the treatment of painful polyneuropathy in diabetics and nondiabetics. *Clin J Pain* 13:313-323.
- Walczak JS, Pichette V, Leblond F, Desbiens K, Beaulieu P (2005) Behavioral, pharmacological and molecular characterization of the saphenous nerve partial ligation: a new model of neuropathic pain. *Neuroscience* 132:1093-1102.

- Walker J, Catheline G, Guilbaud G, Kayser V (1999) Lack of cross-tolerance between the antinociceptive effects of systemic morphine and asimadoline, a peripherally-selective kappa-opioid agonist, in CCI-neuropathic rats. *Pain* 83:509-516.
- Wall PD, Gutnick M (1974) Properties of afferent nerve impulses originating from a neuroma. *Nature* 248:740-743.
- Wall PD, Devor M, Inbal R, Scadding JW, Schonfeld D, Seltzer Z, Tomkiewicz MM (1979) Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain* 7:103-111.
- Wallin J, Schott E (2002) Substance P release in the spinal dorsal horn following peripheral nerve injury. *Neuropeptides* 36:252-256.
- Wang HB, Zhao B, Zhong YQ, Li KC, Li ZY, Wang Q, Lu YJ, Zhang ZN, He SQ, Zheng HC, Wu SX, Hokfelt TG, Bao L, Zhang X (2010) Coexpression of delta- and mu-opioid receptors in nociceptive sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:13117-13122.
- Watkins LR, Maier SF (2002) Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiol Rev* 82:981-1011.
- Watkins LR, Milligan ED, Maier SF (2001) Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci* 24:450-455.
- Wattiez AS, Libert F, Privat AM, Loiodice S, Fialip J, Eschalier A, Courteix C (2011) Evidence for a differential opioidergic involvement in the analgesic effect of antidepressants: prediction for efficacy in animal models of neuropathic pain? *Br J Pharmacol* 163:792-803.
- Webster HH, Salimi I, Myasnikov AA, Dykes RW (1997) The effects of peripheral deafferentation on spontaneously bursting neurons in the somatosensory cortex of waking cats. *Brain Res* 750:109-121.
- Wee Yong V (2010) Inflammation in neurological disorders: a help or a hindrance? *Neuroscientist* 16:408-420.
- Wegert S, Ossipov MH, Nichols ML, Bian D, Vanderah TW, Malan TP, Jr., Porreca F (1997) Differential activities of intrathecal MK-801 or morphine to alter responses to thermal and mechanical stimuli in normal or nerve-injured rats. *Pain* 71:57-64.
- Wei H, Panula P, Pertovaara A (1998) A differential modulation of allodynia, hyperalgesia and nociception by neuropeptide FF in the periaqueductal gray of neuropathic rats: interactions with morphine and naloxone. *Neuroscience* 86:311-319.
- Wei H, Jyvasjarvi E, Niissalo S, Hukkanen M, Waris E, Kontinen YT, Pertovaara A (2002) The influence of chemical sympathectomy on pain responsivity and alpha 2-adrenergic antinociception in neuropathic animals. *Neuroscience* 114:655-668.
- Weng HR, Lee JI, Lenz FA, Schwartz A, Vierck C, Rowland L, Dougherty PM (2000) Functional plasticity in primate somatosensory thalamus following chronic lesion of the ventral lateral spinal cord. *Neuroscience* 101:393-401.
- Wiesenfeld Z, Lindblom U (1980) Behavioral and electrophysiological effects of various types of peripheral nerve lesions in the rat: a comparison of possible models for chronic pain. *Pain* 8:285-298.
- Willenbring S, Beauprie IG, DeLeo JA (1995) Sciatic cryoneurolysis in rats: a model of sympathetically independent pain. Part 1: Effects of sympathectomy. *Anesth Analg* 81:544-548.
- Willoch F, Rosen G, Tolle TR, Oye I, Wester HJ, Berner N, Schwaiger M, Bartenstein P (2000) Phantom limb pain in the human brain: unraveling neural circuitries of phantom limb sensations using positron emission tomography. *Ann Neurol* 48:842-849.

- Willoch F, Schindler F, Wester HJ, Empl M, Straube A, Schwaiger M, Conrad B, Tolle TR (2004) Central poststroke pain and reduced opioid receptor binding within pain processing circuitries: a [¹¹C]diprenorphine PET study. *Pain* 108:213-220.
- Witkamp R, Monshouwer M (2000) Signal transduction in inflammatory processes, current and future therapeutic targets: a mini review. *Vet Q* 22:11-16.
- Wolfe GI, Trivedi JR (2004) Painful peripheral neuropathy and its nonsurgical treatment. *Muscle Nerve* 30:3-19.
- Won SJ, Kim DY, Gwag BJ (2002) Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. *J Biochem Mol Biol* 35:67-86.
- Wood P (2000) Neuroinflammation: mechanisms and management. Totowa: Humana.
- Wood PB, Kablinger AS, Caldito GS (2005) Open trial of pindolol in the treatment of fibromyalgia. *Ann Pharmacother* 39:1812-1816.
- Woolf CJ, Mannion RJ (1999) Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 353:1959-1964.
- Wu G, Ringkamp M, Hartke TV, Murinson BB, Campbell JN, Griffin JW, Meyer RA (2001) Early onset of spontaneous activity in uninjured C-fiber nociceptors after injury to neighboring nerve fibers. *J Neurosci* 21:RC140.
- Wu WP, Hao JX, Fredholm BB, Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ (2006) Effect of acute and chronic administration of caffeine on pain-like behaviors in rats with partial sciatic nerve injury. *Neurosci Lett* 402:164-166.
- Wuarin-Bierman L, Zahnd GR, Kaufmann F, Burcklen L, Adler J (1987) Hyperalgesia in spontaneous and experimental animal models of diabetic neuropathy. *Diabetologia* 30:653-658.
- Xiao HS, Huang QH, Zhang FX, Bao L, Lu YJ, Guo C, Yang L, Huang WJ, Fu G, Xu SH, Cheng XP, Yan Q, Zhu ZD, Zhang X, Chen Z, Han ZG (2002) Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8360-8365.
- Xie J, Park SK, Chung K, Chung JM (2001) The effect of lumbar sympathectomy in the spinal nerve ligation model of neuropathic pain. *J Pain* 2:270-278.
- Xie Y, Zhang J, Petersen M, LaMotte RH (1995) Functional changes in dorsal root ganglion cells after chronic nerve constriction in the rat. *J Neurophysiol* 73:1811-1820.
- Xu F, Gainetdinov RR, Wetsel WC, Jones SR, Bohn LM, Miller GW, Wang YM, Caron MG (2000) Mice lacking the norepinephrine transporter are supersensitive to psychostimulants. *Nat Neurosci* 3:465-471.
- Xu M, Petraschka M, McLaughlin JP, Westenbroek RE, Caron MG, Lefkowitz RJ, Czyzyk TA, Pintar JE, Terman GW, Chavkin C (2004) Neuropathic pain activates the endogenous kappa opioid system in mouse spinal cord and induces opioid receptor tolerance. *J Neurosci* 24:4576-4584.
- Yaksh TL (1989) Behavioral and autonomic correlates of the tactile evoked allodynia produced by spinal glycine inhibition: effects of modulatory receptor systems and excitatory amino acid antagonists. *Pain* 37:111-123.
- Yaksh TL, Al-Rodhan NR, Jensen TS (1988) Sites of action of opiates in production of analgesia. *Prog Brain Res* 77:371-394.
- Yalcin I, Tessier LH, Petit-Demouliere N, Doridot S, Hein L, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2009a) Beta2-adrenoceptors are essential for desipramine, venlafaxine or reboxetine action in neuropathic pain. *Neurobiol Dis* 33:386-394.
- Yalcin I, Tessier LH, Petit-Demouliere N, Waltisperger E, Hein L, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2010) Chronic treatment with agonists of beta(2)-adrenergic receptors in neuropathic pain. *Exp Neurol* 221:115-121.

- Yalcin I, Bohren Y, Waltisperger E, Sage-Ciocca D, Yin J, Freund-Mercier M, Barrot M (2011a) A Time-Dependent History of Mood Disorders in a Murine Model of Neuropathic Pain. *Biol Psychiatry: in revision*.
- Yalcin I, Choucair-Jaafar N, Benbouzid M, Tessier LH, Muller A, Hein L, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2009b) beta(2)-adrenoceptors are critical for antidepressant treatment of neuropathic pain. *Ann Neurol* 65:218-225.
- Yalcin I, Charlet A, Cordero-Erausquin M, Tessier L, Picciotto M, Schlichter R, Poisbeau P, Freund-Mercier M, Barrot M (2011b) Spinal β 2-subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors are critical for the control of nociceptive thresholds. *Pain: in press*.
- Yoshioka M, Shapshak P, Srivastava AK, Stewart RV, Nelson SJ, Bradley WG, Berger JR, Rhodes RH, Sun NC, Nakamura S (1994) Expression of HIV-1 and interleukin-6 in lumbosacral dorsal root ganglia of patients with AIDS. *Neurology* 44:1120-1130.
- Yu W, Hao JX, Xu XJ, Saydoff J, Haegerstrand A, Hokfelt T, Wiesenfeld-Hallin Z (1998) Long-term alleviation of allodynia-like behaviors by intrathecal implantation of bovine chromaffin cells in rats with spinal cord injury. *Pain* 74:115-122.
- Zak-Prelich M, McKenzie RC, Sysa-Jedrzejowska A, Norval M (2003) Local immune responses and systemic cytokine responses in zoster: relationship to the development of postherpetic neuralgia. *Clin Exp Immunol* 131:318-323.
- Zang Y, He XH, Xin WJ, Pang RP, Wei XH, Zhou LJ, Li YY, Liu XG (2010) Inhibition of NF-kappaB prevents mechanical allodynia induced by spinal ventral root transection and suppresses the re-expression of Nav1.3 in DRG neurons in vivo and in vitro. *Brain Res* 1363:151-158.
- Zarrindast M, Valizadeh S, Sahebgharani M (2000) GABA(B) receptor mechanism and imipramine-induced antinociception in ligated and non-ligated mice. *Eur J Pharmacol* 407:65-72.
- Zeilhofer HU (2005) The glycinergic control of spinal pain processing. *Cell Mol Life Sci* 62:2027-2035.
- Zhang ET, Ossipov MH, Zhang DQ, Lai J, Porreca F (2007a) Nerve injury-induced tactile allodynia is present in the absence of FOS labeling in retrogradely labeled post-synaptic dorsal column neurons. *Pain* 129:143-154.
- Zhang JM, Li H, Liu B, Brull SJ (2002) Acute topical application of tumor necrosis factor alpha evokes protein kinase A-dependent responses in rat sensory neurons. *J Neurophysiol* 88:1387-1392.
- Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson S, Altman RD, Arden N, Bierma-Zeinstra S, Brandt KD, Croft P, Doherty M, Dougados M, Hochberg M, Hunter DJ, Kwoh K, Lohmander LS, Tugwell P (2007b) OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, part I: critical appraisal of existing treatment guidelines and systematic review of current research evidence. *Osteoarthritis Cartilage* 15:981-1000.
- Zhang X, Bao L, Shi TJ, Ju G, Elde R, Hokfelt T (1998) Down-regulation of mu-opioid receptors in rat and monkey dorsal root ganglion neurons and spinal cord after peripheral axotomy. *Neuroscience* 82:223-240.
- Zhang XF, Zhu CZ, Thimmapaya R, Choi WS, Honore P, Scott VE, Kroeger PE, Sullivan JP, Faltynek CR, Gopalakrishnan M, Shieh CC (2004) Differential action potentials and firing patterns in injured and uninjured small dorsal root ganglion neurons after nerve injury. *Brain Res* 1009:147-158.
- Zhang Z, Pan ZZ (2010) Synaptic mechanism for functional synergism between delta- and mu-opioid receptors. *J Neurosci* 30:4735-4745.

- Zhao C, Chen L, Tao YX, Tall JM, Borzan J, Ringkamp M, Meyer RA, Raja SN (2007a) Lumbar sympathectomy attenuates cold allodynia but not mechanical allodynia and hyperalgesia in rats with spared nerve injury. *J Pain* 8:931-937.
- Zhao Z, Chen SR, Eisenach JC, Busija DW, Pan HL (2000) Spinal cyclooxygenase-2 is involved in development of allodynia after nerve injury in rats. *Neuroscience* 97:743-748.
- Zhao ZQ, Chiechio S, Sun YG, Zhang KH, Zhao CS, Scott M, Johnson RL, Deneris ES, Renner KJ, Gereau RWt, Chen ZF (2007b) Mice lacking central serotonergic neurons show enhanced inflammatory pain and an impaired analgesic response to antidepressant drugs. *J Neurosci* 27:6045-6053.
- Zhou H (2005) Clinical pharmacokinetics of etanercept: a fully humanized soluble recombinant tumor necrosis factor receptor fusion protein. *J Clin Pharmacol* 45:490-497.
- Zochodne DW, Low PA, Dyck PJ (1989) Adrenergic sympathectomy ablates unmyelinated fibers in the rat 'preganglionic' cervical sympathetic trunk. *Brain Res* 498:221-228.

La douleur neuropathique, souvent chronique, est la conséquence d'une lésion ou d'une maladie du système somatosensoriel. Généralement réfractaire aux traitements antalgiques classiques, les recommandations cliniques mentionnent des antidépresseurs, tricycliques (ATC) ou inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, parmi les premières lignes de traitement de ce type de douleur. L'objectif de ce travail est d'étudier le mécanisme d'action des antidépresseurs dans le traitement de la douleur neuropathique.

La douleur neuropathique est induite par la pose d'un manchon de polyéthylène autour de la branche principale du nerf sciatique droit chez la souris, ce qui entraîne une allodynie mécanique ipsilatérale et persistante. Comme en clinique humaine, un traitement prolongé, mais pas aigu, par un antidépresseur et débutant deux semaines après l'induction de la neuropathie, supprime l'allodynie mécanique dans ce modèle animal. L'effet antiallodynique des ATC s'exerce à travers la stimulation indirecte des récepteurs β_2 -adrénergiques (β_2 -AR).

La première partie de ce travail a pour but de localiser l'action thérapeutique des antidépresseurs et des β_2 -mimétiques et de mettre en évidence le mécanisme moléculaire par lequel ils exerceraient leur effet thérapeutique contre la douleur neuropathique. Des lésions noradrénergiques périphériques et/ou centrales, nous ont permis de montrer que le site d'action des antidépresseurs est périphérique, principalement dans les ganglions rachidiens où les β_2 -AR sont détectés sur des cellules non neuronales en combinant des techniques de PCR sur cellule unique et d'imagerie calcique. L'étude des modifications d'expression génique et protéique dans le ganglion rachidien révèle que l'augmentation de l'expression du TNF- α associée à la neuropathie est corrigée avec un traitement par un antidépresseur.

La seconde partie de ce travail concerne l'implication des récepteurs opioïdes dans l'effet antiallodynique des antidépresseurs. Des travaux antérieurs ont montré le rôle des récepteurs δ -opioïdes dans l'action d'un antidépresseur. En utilisant des lignées de souris déficientes pour les récepteurs opioïdes, nous avons mis en évidence que les récepteurs δ -opioïdes sont les seuls représentants de la composante opioïdergique indispensable à l'effet antiallodynique d'un antidépresseur ou d'un β_2 -mimétique.

En conclusion, ces résultats suggèrent que l'effet antiallodynique des antidépresseurs, en traitement prolongé sur une neuropathie périphérique installée, se localise en périphérie recrutant les β_2 -AR des cellules non neuronales du ganglion rachidien. Cet effet mettrait en jeu des régulations d'expression génique et protéique du TNF- α ainsi que le récepteur δ -opioïdes.

Mots clés : douleur neuropathique ; antidépresseur ; récepteur β_2 -adrénergique ; récepteur δ -opioïde ; TNF- α ; ganglion rachidien ; système nerveux sympathique.