



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



ÉCOLE DOCTORALE des Science de la Vie et de la Santé

Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives

CNRS UPR 3212

Equipe « Exploration fonctionnelle de la douleur »

THÈSE présentée par :

Marie-Andrée COULOMBE

soutenue le : 26 juin 2013

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Neurosciences

**Implication du sexe, des hormones
gonadiques et de leurs métabolites
dans la réponse nociceptive et la
perception de la douleur**

THÈSE dirigée par :

Pr Pierrick Poisbeau
Pr Serge Marchand

PhD, université de Strasbourg
PhD, université de Sherbrooke

RAPPORTEURS :

Pr Étienne Challet
Pr Éric Rousseau

PhD, université de Strasbourg
PhD, université de Sherbrooke

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Pr Pierre Beaulieu

MD, PhD, université de Montréal



Marie-Andrée COULOMBE

Implication du sexe, des hormones gonadiques et de leurs métabolites dans la réponse nociceptive et la perception de la douleur

Résumé

Plusieurs variables biologiques, psychologiques, ainsi que des différences culturelles, ont été mises en cause afin d'expliquer la différence de perception de la douleur existante entre les hommes et les femmes. Il est connu que les hormones gonadiques influencent la réponse nociceptive chez l'animal et chez l'humain. Le cerveau a aussi la capacité de synthétiser ses propres "hormones sexuelles", les neurostéroïdes. L'objectif de cette thèse était: 1) évaluer les facteurs physiologiques et psychologiques influençant de perception de la douleur chez les hommes et les femmes, 2) évaluer l'implication des androgènes et du cortisol sur les symptômes cliniques et la perception de la douleur chez des sujets atteints de fibromyalgie et sains, et 3) évaluer l'implication des hormones gonadiques et de leurs métabolites $3\alpha5\alpha$ -réduits dans la transmission et la modulation de la douleur chez animaux les mâles et les femelles par l'utilisation de modèles de douleur comportementaux.

Mots clés : Douleur; Nociception; Sexe; Genre; Stéroïdes; Neurostéroïdes; Récepteur $GABA_A$

Résumé en anglais

Several biological, psychological, and cultural differences can explain the difference in pain perception between men and women. It is known that gonadal hormones influence the nociceptive response in animals and humans. The brain also has the ability to synthesize its own "sex hormones", also named neurosteroids. The aims of this thesis were: 1) to assess the physiological and psychological factors influencing the difference in pain perception between men and women, 2) to relate the levels of androgens and cortisol with clinical symptoms and pain perception in healthy volunteers and patients with fibromyalgia, and 3) to evaluate the involvement of gonadal hormones and of their $3\alpha5\alpha$ -reduced metabolites in the transmission of pain and the effectiveness of descending pain modulation systems (DPMS) in males and females using behavioral pain model in rats and mice.

Keywords: Pain; Nociception; Sex; Gender; Steroids; Neurosteroids; $GABA_A$ receptors

But just as there is no flat map that is a good representation of the earth's entire surface, there is no single theory that is a good representation of observations in all situations.

- Stephen Hawking

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	IV
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES.....	VIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	X
1 INTRODUCTION	1
1. Recension des écrits : La douleur et ses mécanismes de modulation.....	2
1.1 Introduction à la douleur	2
1.2 Mécanisme de la douleur : Les voies ascendantes.....	6
1.3 Mécanismes de modulation de la douleur : Les voies descendantes	17
1.4 Modulation de la douleur par le système nerveux autonome	25
1.5 Modulation de la douleur par l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS).....	26
1.6 Modulation de la douleur par la gestion émotionnelle et la personnalité.....	30
1.7 La fibromyalgie	35
2. Le rôle des stéroïdes et des neurostéroïdes dans les mécanismes de transmission et de modulation de la douleur chez les hommes et les femmes	38
2.1 L'action des stéroïdes et des neurostéroïdes dans le système nerveux central.....	39
2.2 Différence de perception de la douleur entre les mâles et les femelles.....	51
2.3 L'action des stéroïdes et des neurostéroïdes dans la modulation de la douleur	65
OBJECTIFS	76
CHAPITRE TRADITIONNEL.....	77
1. Mise en contexte.....	77
2. Objectif de l'étude.....	80
2.1 Questions de recherche	80
2.2 Objectif général	80
2.3 Objectifs spécifiques.....	80
3. Matériel et méthodes.....	81
3.1 Devis de l'étude	81
3.2 Population à l'étude	81
3.3 Variables et instruments de mesure	81

3.4 Mesure de la douleur: Test de la thermode	82
3.5 Activité du système nerveux autonome : Variabilité du rythme cardiaque.....	83
3.6 Flot sanguin :	84
3.7 Activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien	84
3.8 Mesures psychométriques	84
3.9 Schéma expérimental	90
3.10 Analyse statistique	90
4. Résultats	92
4.1 Description de l'échantillon	92
4.2 Perception de la douleur chez les hommes et les femmes.....	99
4.3 Facteurs influençant la perception de la douleur chez l'humain	108
4.4 Interrelation entre le sexe et les facteurs psychologiques influençant la douleur	113
5. Discussion.....	119
ARTICLE 1.....	125
ARTICLE 2.....	154
ARTICLE 3.....	190
ARTICLE 4.....	223
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	252
1. Différence de perception de la douleur entre les hommes et les femmes.....	252
1.1 Retour sur les différences de perception de la douleur chez les hommes et les femmes: projet 12-109	252
1.2 Comparaison des différences de perception de la douleur chez l'humain et chez l'animal	253
1.3 Neurobiologie de la perception d'une situation potentiellement dangereuse chez l'animal	254
1.4 Réponse nociceptive des mâles et des femelles lors du test de la plaque chaude dynamique	256
2. Implication des hormones gonadiques et adrénérigiques dans la modulation de la douleur	258
2.1 Rôle des hormones stéroïdiennes dans la perception de la douleur chez les sujets sains.	259
2.2 Rôle des hormones stéroïdiennes dans la perception de la douleur chez les sujets atteints de fibromyalgie	260
2.3 Le rôle de l'allostase dans les pathologies de douleur chronique	261

3. Implication des métabolites 3α5α-réduits dans la modulation de la douleur	262
3.1 La variabilité des différences de réponses nociceptives chez les mâles et les femelles ...	263
3.2 Le paradigme de nage forcée.....	264
3.3 Rôles des métabolites 3 α 5 α -réduits dans la réponse nociceptive chez les mâles et les femelles.....	265
3.4 Implication des variations hormonales associées au cycle menstruel dans la transmission et la modulation de la douleur.....	267
CONCLUSION	273
REMERCIEMENTS	276
LISTE DES RÉFÉRENCES.....	277
ANNEXE 1: COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS	309

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Action des stéroïdes sur les différents récepteurs du système nerveux central. .	45
Tableau 2. Relation entre les souches de souris, le sexe et la réponse nociceptive à différents tests comportementaux	54
Tableau 3. Comparaison des réponses nociceptives des mâles et des femelles dans différents modèles de douleur.....	55
Tableau 4. Implication des hormones gonadiques dans la réponse nociceptive.....	55
Tableau 5. Variation des conditions douloureuses au cours du cycle ovarien chez les animaux et les humains.....	58
Tableau 6. Séance expérimentale.....	90
Tableau 7. Description sociodémographique des populations à l'étude	95
Tableau 8. Facteurs influençant la douleur	110
Tableau 9. Perception de la douleur et gestion active de celle-ci	111
Tableau 10. Influence de la variabilité cardiaque sur la perception de la douleur.....	112
Tableau 11. Covariation de la perception de la douleur lors de la rampe rapide.....	114
Tableau 12. Covariation de la perception de la douleur lors de la rampe lente.....	115
Tableau 13. Facteurs psychologiques impliqués dans la douleur indépendamment du sexe	118

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Transmission de la douleur.....	3
Figure 2. Modèle présentant les différentes composantes de la douleur et leurs interactions suite à l'intégration d'un stimulus potentiellement dommageable à l'organisme	5
Figure 3. Schématisation simplifiée de la diversité de nocicepteurs présents sur les fibres C	8
Figure 4. Schéma simplifié de l'organisation spinale et des connexions des fibres afférentes primaires	10
Figure 5. Les voies lemniscale et spinothalamique	12
Figure 6. L'intégration supraspinale de l'information nociceptive.....	13
Figure 7. Les voies spinothalamiques.....	15
Figure 8. Vue simplifiée des systèmes ascendant et descendant de la douleur	19
Figure 9. Observation du CIDN chez l'animal.....	23
Figure 10. Schéma de synthèse des hormones stéroïdiennes par les glandes surrénales.....	40
Figure 11. Différents mécanismes d'action des stéroïdes.....	42
Figure 12. Le récepteur GABA _A , ses domaines transmembranaires et la liaison des neurostéroïdes	48
Figure 13. Différence de la réponse nociceptive des mâles et des femelles au test à la formaline	53
Figure 14. Concentration de progestérone, d'estradiol, de LH et d'allopregnanolone à travers le cycle menstruel.	62
Figure 15. Effet biphasique des neurostéroïdes.	64
Figure 16. Échelle visuelle analogue	82
Figure 17. Thermode de type «CHEPS»	83
Figure 18. Description du tempérament, du caractère et du genre des hommes et des femmes participants à l'étude.....	96
Figure 19. Comparaison de l'état émotionnel et des stratégies de gestion de la douleur entre les hommes et les femmes	97
Figure 20. Rôle du sexe dans les attentes envers la douleur.....	98
Figure 21. Douleur rapportée lors de la rampe rapide et de la rampe lente.....	101
Figure 22. Perception de la douleur et gestion émotionnelle.....	102

Figure 23. Comparaison l'activité du système nerveux autonome au repos chez les hommes et les femmes	103
Figure 24. Comparaison de la réactivité du système nerveux autonome chez les hommes et les femmes en situation nociceptive	104
Figure 25. Réactivité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.....	106
Figure 26. Différence de microcirculation entre les hommes et les femmes.....	107
Figure 27. Transport des ions chlorures par les cotransporteurs NKCC1 et KCC2 dans les mécanismes de douleur.....	270

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACTH	Adrénocorticotrophine
αdiol	3α-androstanediol
AIS	Analgésie induite par le stress/ <i>Stress-induced analgesia</i>
AP	Alloprégnanolone
AR	Récepteur de l'androgène
ATP	Adénosine triphosphate
CGRP	Calcitonin <i>gene-related peptide</i>
CIDN	Contrôle inhibiteur diffus nociceptif
CLIP	<i>Corticotrophin Like Intermediate Lobe Peptide</i>
CPF	Cortex préfrontal
CRH	<i>corticotrophin-releasing hormone</i>
DHEA	Dihydroépiandrostènedione
DHEAS	Dihydroépiandrostènedione sulfate
DHEA(S)	Dihydroépiandrostènedione et dihydroépiandrostènedione sulfate
ER	Récepteur de l'estrogène
ÉVA	Échelle visuelle analogue
FC	Fréquence cardiaque
FIQ	<i>Fibromyalgia Impact Questionnaire</i>
GABA	Acide gamma-amino-butyrrique
GAD	Glutamate décarboxylase
GPCR	Récepteur couplé à une protéine G
HF	Haute fréquence, entre 0.15 et 0.4 Hz
HHS	Hypothalamo-hypophyso-surrénalien
ICT	Inventaire du caractère et du tempérament de Cloninger
LF	Basse fréquence, entre 0.04 et 0.15 Hz
LPH	Lipotropine
MMPI	<i>Minnesota Multiphasic Personality Inventory</i>
MOR	Récepteur des opioïde de type mu
MRV	Médulla rostroventrale
MSH	Mélanotropine
NN50	Nombre d'intervalles RR successifs supérieurs à 50 ms
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartique
NRM	Noyau du raphé magnus
NTS	Noyau du tractus solitaire
Nu	Unité normalisée / <i>Normalized units</i>
PKC	Protéine kinase C
POMC	Proopiomélanocortine
PR	Récepteur de la progestérone
Preg	Prégnènone
PregS	Prégnènone sulfate
PVN	Noyau paraventriculaire / <i>Paraventricular nucleus</i>
RMSSD	Racine carrée de la moyenne des différences d'intervalles RR successifs au carré

SDNN	Déviatiun standard de l'intervalle RR sur toute la période d'enregistrement
SGPA	Substance grise périaqueducale
SNA	Système nerveux autonome
SOPK	Syndrome des ovaires polykystiques
SRD	<i>Subnucleus reticularis dorsalis</i>
THDOC	Tetrahydrodioxycorticostérone
TSPO	Protéine de translocation
VRC	Variabilité du rythme cardiaque
WDR	Neurone à large gamme dynamique / <i>Wide dynamic range neuron</i>
WPI	Index de douleur diffuse / <i>Widespread pain index</i>

INTRODUCTION

La douleur est l'une des principales causes de consultation et d'invalidité auxquelles sont aux prises plusieurs personnes. En effet, il est estimé qu'au cours d'une vie, environ 50% à 80% de la population souffrira d'une forme quelconque de douleur chronique (Koch, 1986). En terme de coût annuel, cela représente une somme de 40 milliards de dollars \$US pour l'économie américaine (Sheehan *et al.*, 1996).

Au Canada, il est estimé qu'environ 1,5 million de personnes de 15 à 64 ans sont touchées par des incapacités liées à la douleur. On décrit que plus de 29% des personnes âgées de plus de 18 ans seraient limitées dans leurs activités en raison de douleurs (Moulin *et al.*, 2002). Cette même étude soutient que les femmes sont généralement plus touchées que les hommes (31% des femmes et 27% des hommes) (Moulin *et al.*, 2002). Cette prédominance des cas de douleurs chroniques chez les femmes par rapport aux hommes est aussi rapportée en Europe, en Amérique du Sud et en Australie (Farooqi et Gibson, 1998; Lindell *et al.*, 2000; Blyth *et al.*, 2001; Carmona *et al.*, 2001; Senna *et al.*, 2004).

Récemment, des études expérimentales réalisées chez l'humain et chez l'animal ont démontré une différence de perception de la douleur entre les deux sexes. Plusieurs hypothèses ont été explorées pour expliquer les différences de perception de douleur entre les hommes et les femmes, entre autre, des variables telles que les facteurs biologiques, psychologiques, la culture, l'apprentissage des rôles sociaux et l'histoire personnelle (Berkley, 1997; Fillingim *et al.*, 2009). Ces études ont démontré que des différences physiologiques notables, particulièrement associées aux hormones sexuelles. Cependant, cet élément physiologique ne peut fournir qu'une explication partielle à cette différence de la perception de la douleur entre les hommes et les femmes. Ce serait donc un ensemble de causes biologiques et psychologiques qui aurait pour conséquence une sensibilité à la douleur différente entre les sexes.

1. Recension des écrits : La douleur et ses mécanismes de modulation

1.1 Introduction à la douleur

La douleur représente une perception subjective se définissant comme «une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à des lésions tissulaires réelles ou potentielles ou décrite en termes de telles lésions» (IASP, 1994). Lorsque l'on parle des mécanismes neurophysiologiques associés à la douleur, le terme nociception est plutôt utilisé. Les nocicepteurs sont activés par des stimulations mécaniques, thermiques ou chimiques. Conséquemment, il y a création d'une activité chimioélectrique qui se propage à travers des fibres sensorielles (A β , A δ et C). Ces dernières s'étendent de la périphérie à la moelle épinière, où l'information est redirigée afin d'être intégrée en terme d'intensité, de qualité et d'appréciation spatio-temporelle (Figure 1). Ce sont ces signaux qui permettent finalement l'activation des muscles effecteurs au besoin. La douleur est modulée par un système de régulation complexe.

Le terme nociception est défini, selon l'«*International Association for the Study of Pain*» (IASP), comme étant l'activité chimioélectrique des récepteurs et des fibres nerveuses provoquée par une stimulation potentiellement dangereuse pour l'organisme. Il s'agit en fait de l'ensemble des composantes neurophysiologiques mis en œuvre dans les mécanismes de défense du corps (par exemple un réflexe de retrait) et la perception de la douleur (qui est l'intégration cognitive résultant de l'activation des nocicepteurs). En d'autres termes, la douleur joue un rôle de signal d'alarme pour le corps, afin de le prévenir d'une atteinte à son intégrité physique (Rey, 2011).

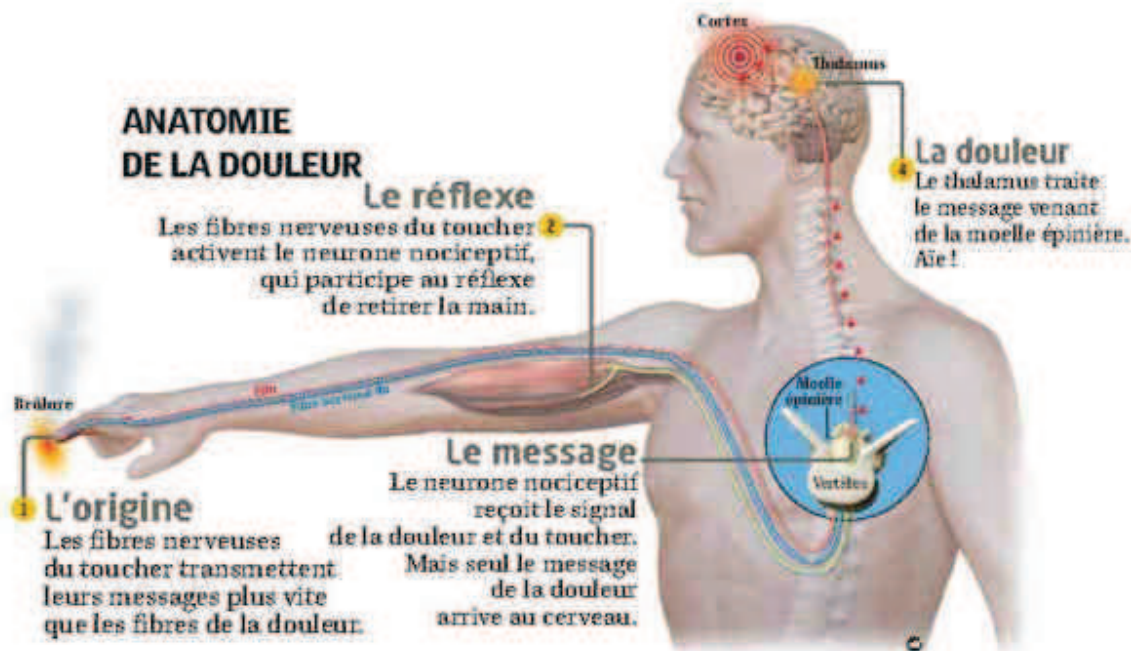


Figure 1. Transmission de la douleur

Dans cet exemple, la douleur est produite par un stimulus nociceptif, qu'il soit mécanique, thermique ou chimique. La stimulation nociceptive induit généralement la dépolarisation des terminaisons libres afin de créer des potentiels d'action qui seront transmis par les fibres afférentes nociceptives A δ et C (plus de détails seront décrits dans le texte). Ces fibres, sont issues des neurones sensoriels dont les corps cellulaires sont situés dans les ganglions rachidiens dorsaux et les ganglions des nerfs trijumeaux, et permettent la propagation des potentiels d'action de la périphérie vers la moelle épinière. Dans leur portion centrale, elles pénètrent par la racine dorsale de la moelle épinière et établissent des synapses avec un neurone de 2^{ème} ordre. Ce sont ces neurones de 2^{ème} ordre qui transmettent l'information nociceptive vers les centres supraspinaux où l'information nociceptive est intégrée par différentes parties du cortex pour devenir la douleur perçue. Image tirée de (Anthony, 2013).

La douleur peut être décomposée en quatre grandes sphères caractéristiques (Figure 2). Tout d'abord, l'aspect sensori-discriminatif permet la localisation et la mesure de l'intensité d'un stimulus nociceptif. La composante motivo-affective met en jeu l'ensemble du système limbique et permet l'incorporation de l'aspect émotionnel associé à la douleur. L'aspect cognitif permet de concentrer son attention et d'anticiper certains événements ou sensations par la mémorisation préalable de la douleur. Finalement, la dimension comportementale induit une réaction aversive au stimulus nociceptif, qu'elle soit

motrice, verbale et/ou végétative (Calvino et Grilo, 2006). Ces différentes sphères ne sont pas indépendantes, mais bien interrelationnelles (Figure 2). En effet, les différentes régions impliquées dans ces différents aspects sont tous interliées et peuvent influencer les un sur les autres. En effet, l'intensité de la douleur influencera nécessairement la composante motivo-affective et la composante cognitivo-comportementale. Une seule stimulation nociceptive peut ainsi déclencher un long enchainement d'évènements moléculaires, menant à l'intégration de toutes ces facettes de la douleur. Ce concept a évolué avec le temps. En effet, puisque le nombre de région et d'élément impliqué dans la réaction à une stimulation douloureuse est si complexe, le concept de «neuromatrice» de la douleur a été mis sur pied par Ronald Melzack.

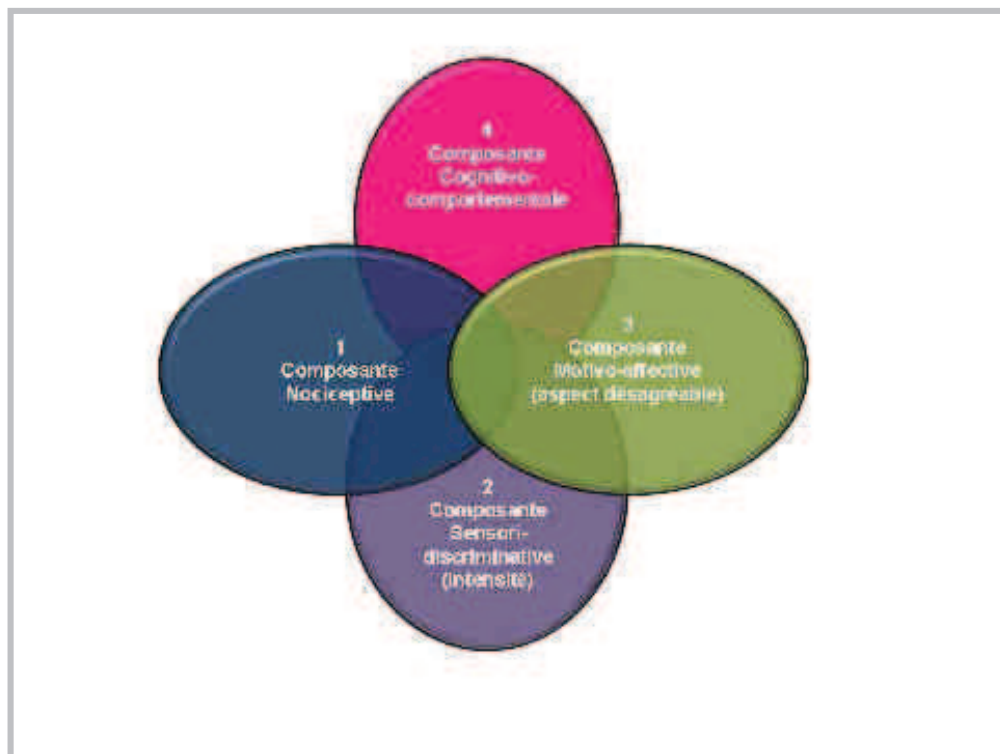


Figure 2. Modèle présentant les différentes composantes de la douleur et leurs interactions suite à l'intégration d'un stimulus potentiellement dommageable à l'organisme

Dans ce modèle, la douleur est composée de plusieurs sphères distinctes, mais qui se chevauchent : la composante comportementale, la composante nociceptive, la composante motivo-affective et la composante sensori-discriminative. Adaptation d'une image tirée du livre (Marchand, 1998) par Émilie Paul-Savoie.

Il existe plusieurs types de douleur qui ont des caractéristiques distinctes. La douleur aiguë est une douleur vive et immédiate. Elle ne dure que quelques secondes, voire quelques minutes, et est généralement causée par un stimulus thermique, mécanique ou électrique (Guirimand et Le Bars, 1996; Serpell *et al.*, 1998). La douleur inflammatoire (par excès de nociception), quant à elle, est généralement créée par une lésion tissulaire, mais peut se présenter pour d'autres raisons. Entre autre, lors d'une blessure, il y a libération de médiateurs de l'inflammation telle que la substance P, le «*calcitonin gene-related peptide*» (CGRP), l'histamine, la bradykinine, des prostaglandines et la sérotonine. Ces substances sont algogènes et facilitent le déclenchement d'influx nerveux par l'interaction avec des canaux ioniques (la sérotonine et les protons) ou

métabotropiques (la bradykinine, la substance P, l'histamine) (Basbaum et Woolf, 1999; Julius et Basbaum, 2001). La douleur neuropathique est produite par une dysfonction ou une lésion du système nerveux. Ces lésions peuvent être associées à une démyélinisation des fibres nerveuses, entres autres produit par certains médicaments, comme le paclitaxel ou la vincristine, ou par certaines pathologies comme le diabète. Les douleurs neuropathiques peuvent aussi se présenter lors de lésions nerveuses, par exemple lors de chirurgies ou d'amputation (pour ne nommer que quelques exemples). Ce type de douleur provoque de l'allodynie, de l'hyperalgésie, des douleurs spontanées, de la paresthésie et de la dysesthésie (Wall *et al.*, 2006). Finalement, la douleur est dite chronique lorsqu'elle persiste pendant plus de trois mois (selon les critères de l'IASP). La douleur chronique peut être causée par de l'inflammation et/ou à une sensibilisation des nocicepteurs des voies transmettant l'influx nociceptif au niveau spinal (Calvino et Grilo, 2006).

1.2 Mécanisme de la douleur : Les voies ascendantes

Une sensation douloureuse s'amorce par la stimulation des nocicepteurs qui sont des terminaisons libres que l'on retrouve parmi les fibres nerveuses de la peau, des muscles et des viscères (Guirimand et Le Bars, 1996; Coutaux *et al.*, 2005). Ces nocicepteurs utilisent l'énergie du stimulus, qu'il soit thermique, mécanique ou chimique, et le convertissent en énergie électrochimique (Julius et Basbaum, 2001; Coutaux *et al.*, 2005). Il existe plusieurs mécanismes de transduction permettant la détection de stimuli nociceptifs ; on décrit notamment les canaux «*transient receptor potential*» (TRP) pour la détection de la chaleur, les canaux de la degenerine (ENaC/DEG, *Epithelia Na⁺ Channel/DEGenerin*) pour la détection des stimuli mécaniques, et le récepteur vamilloïde (VR1), les «*acid-sensing ion channels*» (ASICs) et TRPA1 pour la détection des stimuli chimiques (Julius et Basbaum, 2001; Basbaum *et al.*, 2009). Ces détecteurs moléculaires de la douleur produisent la dépolarisation de la membrane cellulaire par l'entrée d'ion Na⁺ et Ca²⁺ créant ainsi l'influx nerveux. La dépolarisation d'une fibre dépend de l'intensité du stimulus, des détecteurs moléculaires présents à la surface (noci-récepteurs) et du type de fibre nerveuse (voir Figure 3 pour plus de

détails, ou la revue de littérature (Dubin et Patapoutian, 2010)). Si la dépolarisation initiale produite par les noci-récepteurs est suffisante (amplitude, durée), alors les canaux sodium s'ouvriront et un ou plusieurs potentiels d'action seront produits. Selon le type et l'intensité du stimulus, différents types de neurones sensoriels seront activés. Il existe schématiquement trois types de fibres nerveuses somatiques conduisant l'information sensorielle : les fibres A β , A δ et C. Ces classes sont relatives à leur diamètre, leur vitesse de transmission, et les informations sensorielles qu'elles transportent. Les fibres A β sont des fibres myélinisées de grand calibre (6 - 20 μm). La gaine de myéline est formée par un enroulement de membranes, d'une composition lipidique et protéique particulière, des cellules de Schwann qui protège l'axone et l'isole électriquement. Une augmentation de l'épaisseur de l'enroulement de membrane augmente la distance entre les nœuds de Ranvier et ceci entraîne une augmentation de la conduction des potentiels d'action. En effet, ce sont les courants ioniques et les lignes de champ qui déterminent la conduction saltatoire. L'information non nociceptive, telle que le toucher ou la proprioception, se propage dans ces fibres à grande vitesse (30 - 120 m/s) car elle est portée par des fibres de gros diamètre A β fortement myélinisées. Les fibres nociceptives sont (généralement) les fibres A δ et C (Julius et Basbaum, 2001; Wall *et al.*, 2006; Dubin et Patapoutian, 2010). Comparativement aux fibres A β , les fibres A δ sont de plus petit calibre (2 à 5 μm) et faiblement myélinisées. Cela leur permet de transmettre l'information relativement rapidement (4 - 40 m/s) (Julius et Basbaum, 2001; Wall *et al.*, 2006; Basbaum *et al.*, 2009). Les fibres nociceptives A δ prennent principalement en charge les stimuli mécaniques. Finalement, les fibres C, appelées également nocicepteurs polymodaux, sont de beaucoup plus petit calibre (0,3 - 3 μm), ne sont pas myélinisées et transportent l'information nociceptive (mécanique, thermique et chimique) de façon plus lente (environ 2 m/s). Ces fibres sont les plus abondantes puisqu'elles représentent 80 % des fibres afférentes cutanées (Kumazawa, 1990).

Les fibres A δ et C sont responsables respectivement de la première et de la seconde douleur. La première douleur est localisée et rapide ; elle est liée à

l'activation des fibres A δ . La seconde douleur est diffuse et lente ; elle correspond à l'activation des fibres C.

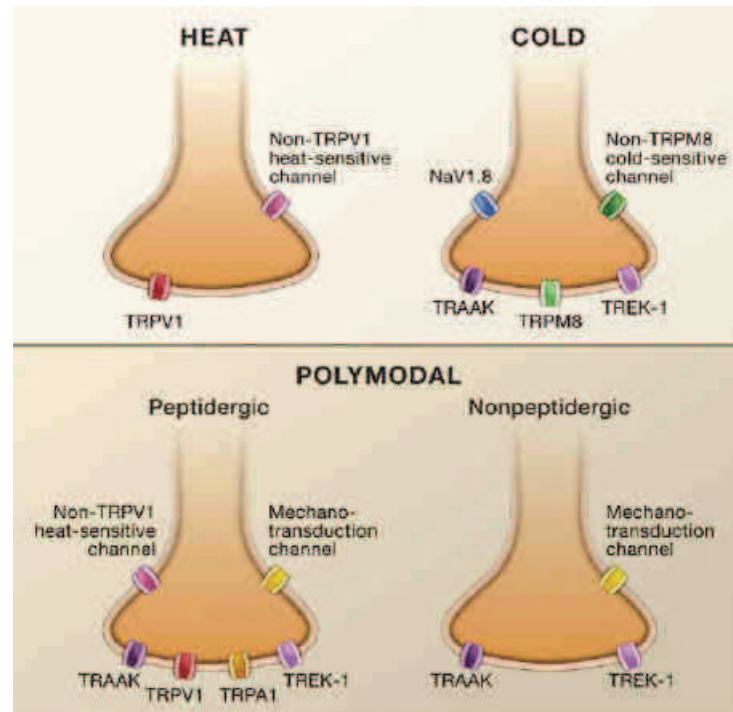


Figure 3. Schématisation simplifiée de la diversité de nocicepteurs présents sur les fibres C

Les stimuli nociceptifs (chaud, froid, mécanique) sont traduits par différents canaux ioniques. TRAAK et TREK-1 sont des canaux potassiques qui permettent l'activation des nocicepteurs. Il est important de mentionner que ces différents senseurs de sont pas nécessairement co-exprimés sur une même terminaison nerveuse. Image tirée de (Basbaum *et al.*, 2009). Droits de reproduction obtenus # 11071729.

Les fibres afférentes entrent dans le système nerveux central par les cornes dorsales de la moelle épinière où elles font synapse avec des neurones de 2^{ème} ordre (interneurones ou neurones de projection). Les neurones de projection sont en charge de la transmission des informations nociceptives vers les centres supérieurs. La moelle épinière est une étape très importante de la transmission nociceptive puisqu'il s'agit non seulement de l'étape de transition entre la périphérie et les centres supérieurs, mais aussi une étape de modulation, où l'information nociceptive peut être inhibée ou amplifiée. La substance blanche de la moelle est une zone formée de fibres myélinisées. Elle contient les axones des

cellules nerveuses ascendantes et descendantes. La substance grise est composée principalement de corps cellulaires et de cellules gliales (Brasseur *et al.*, 1997). Elle se divise en 10 lames, dont 6 sont situées dans la corne dorsale, 3 dans la corne ventrale et une entourant l'épendyme (Brasseur *et al.*, 1997).

Les neurones nociceptifs, comme les neurones sensoriels, sont glutamatergiques. Lors de leur activation, les potentiels d'action atteignent la synapse. Ensuite, ils induisent l'activation des canaux calcium voltage-dépendants et l'entrée de Ca^{2+} dans la synapse provoque la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane. Cela permet la libération du/des neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Le neurotransmetteur principal est le glutamate et, parfois, d'autres neuropeptides sont libérés, comme la substance P et le CGRP. En ce qui concerne le glutamate, plusieurs types de récepteurs peuvent être activés dont les récepteurs-canaux NMDA qui jouent un grand rôle dans les phénomènes de sensibilisation centrale (plasticité synaptique) et l'apparition des symptômes douloureux.

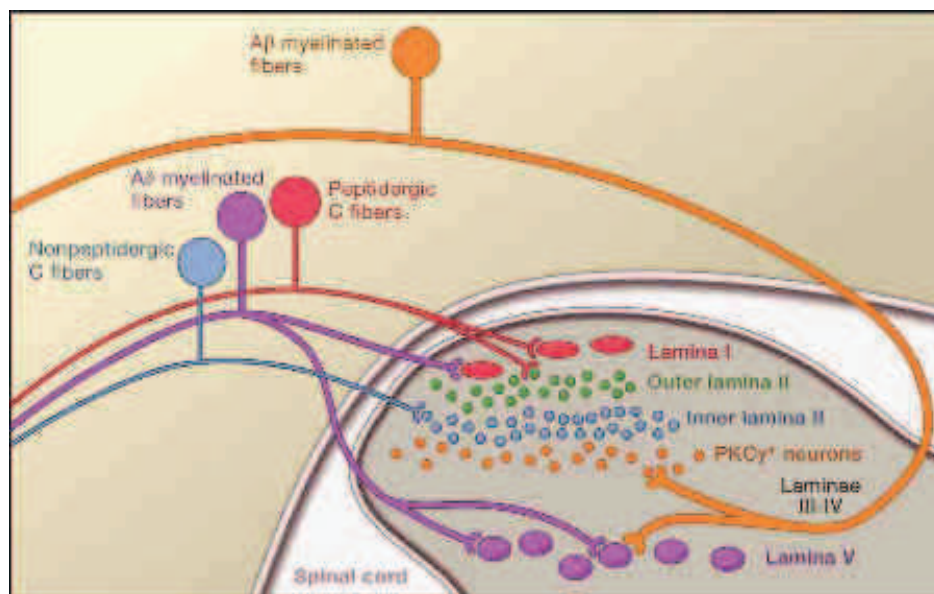


Figure 4. Schéma simplifié de l'organisation spinale et des connexions des fibres afférentes primaires

Les fibres afférentes primaires pénètrent dans la corne dorsale de la moelle épinière. L'organisation des différentes lames est très précise. Les fibres A δ et C (peptidergiques) arrivent dans la lame I. Ces fibres afférentes font synapse avec des neurones de projections (rouge) et des interneurones (vert). Les connexions avec les interneurones sont représentées en vert, en bleu et en orange, et sont plutôt localisées dans la lame II. Chaque type de fibre possède des propriétés différentes et des rôles particuliers dans la transmission de l'influx nociceptif. Notamment, les interneurones contenant l'isoforme γ de la protéine kinase C (PKC) ont un rôle excitateur et sont impliqués dans les douleurs neuropathiques (Malmberg *et al.*, 1997). Image tirée de (Basbaum *et al.*, 2009). Droits de reproduction obtenus # 11071729.

Tel qu'illustré à la Figure 4, la lame I reçoit des afférences des fibres sensorielles A δ et C (peptidergique) (Basbaum *et al.*, 2009). Ces fibres sont spécifiques à la nociception. Elles peuvent aussi être activées par des thermorécepteurs détectant des stimulations non nociceptives thermiques froides ou chaudes. Les fibres C non peptidergiques projettent vers les interneurones de la lame II interne. Les fibres projetant vers les lames III et IV sont généralement non-nociceptives (A β). La lame V reçoit des projections de fibres sensorielles non-nociceptives et nociceptives de type A β , A δ et C (*via* des projections indirectes). Les neurones de cette région sont majoritairement des neurones à

large gamme dynamique (WDR, «*wide dynamic range*»), qui répondent à des stimulations nociceptives et non nociceptives, mais aussi à des stimulations à faible seuil et à haut seuil d'activation (Basbaum *et al.*, 2009). Les neurones des lames VII-VIII, comme les neurones de la lame V, répondent à des stimulations nociceptives et non nociceptives. Cependant, ces neurones peuvent être activés ou inhibés par différents types de stimulations, qu'elles soient proprioceptives ou viscérales.

En résumé, les cornes dorsales sont importantes dans l'étude de la douleur puisque c'est à ce niveau que pénètre une majorité de fibres nociceptives A δ et C, répondant aux stimuli périphériques de haute intensité. Ces fibres innervent particulièrement les couches superficielles I et II, ainsi que plus profondément dans les couches V, VI, VII et X. C'est à cet endroit que les fibres afférentes primaires font synapse avec les neurones de 2^{ème} ordre (Brasseur *et al.*, 1997). Dans le cas des fibres non nociceptives A β , lors de leur entrée dans la moelle, elles se divisent en deux branches. La première branche est ascendante et permet aux fibres de pénétrer sur plusieurs segments de la substance grise médullaire. La seconde branche rejoint la jonction cervico-bulbaire où elle forme la voie lemniscale (Wall *et al.*, 2006) (Figure 5).

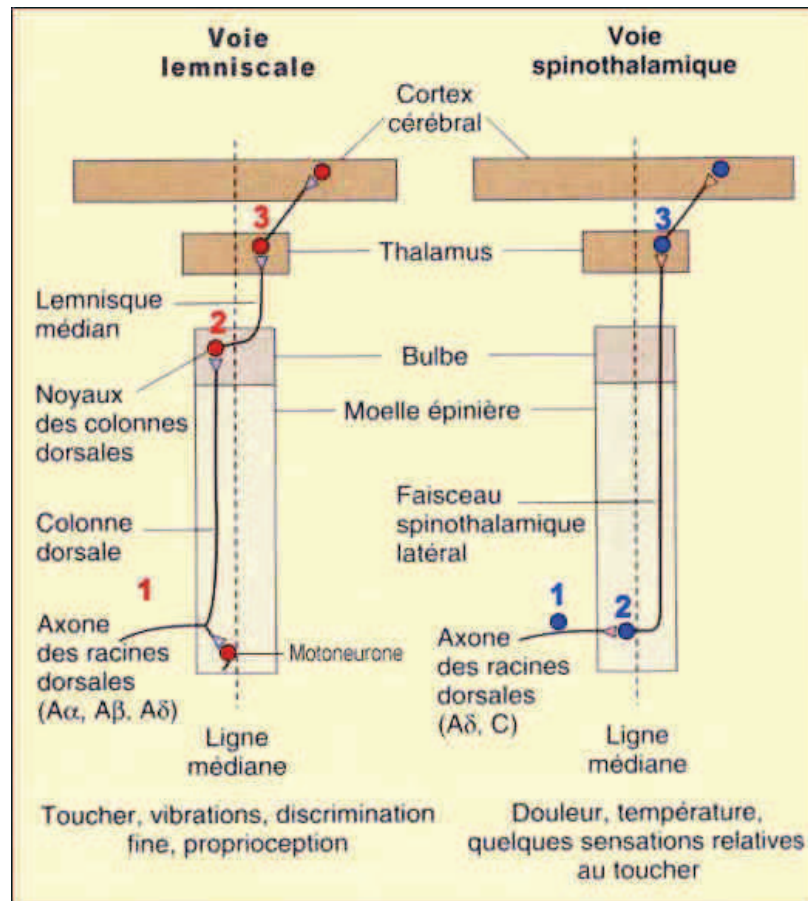


Figure 5. Les voies lemniscale et spinothalamique

En fonction du type de stimulus, non nociceptif ou nociceptif, l'influx nerveux empruntera des voies de transmission différentes. Les stimuli non nociceptifs sont transmis par la voie lemniscale qui emprunte la colonne dorsale vers les centres supérieurs (en rouge). Les stimuli nociceptifs sont transmis par la voie spinothalamique, de façon contralatérale après décussation spinale. Image tirée du site internet Le cerveau à tous les niveaux (Dubuc, 2002c)(Copyleft).

Les informations nociceptives sont transmises vers de nombreuses régions du cerveau permettant l'intégration de la composante sensori-discriminative (voie spinothalamique vers le cortex somatosensoriel S1 et S2), et de la composante motivo-affective (voie spinoréticulaire vers le cortex cingulé antérieur et l'insula) (Figure 6). En effet, les projections ascendantes peuvent être de différents types, soit : 1) une projection directe vers le thalamus (voie spinothalamique), 2) une projection directe vers le tronc cérébral permettant la modulation du contrôle homéostatique, 3) des projections directes vers l'hypothalamus (voie spinohypothalamique) (ces voies seront décrites plus bas).

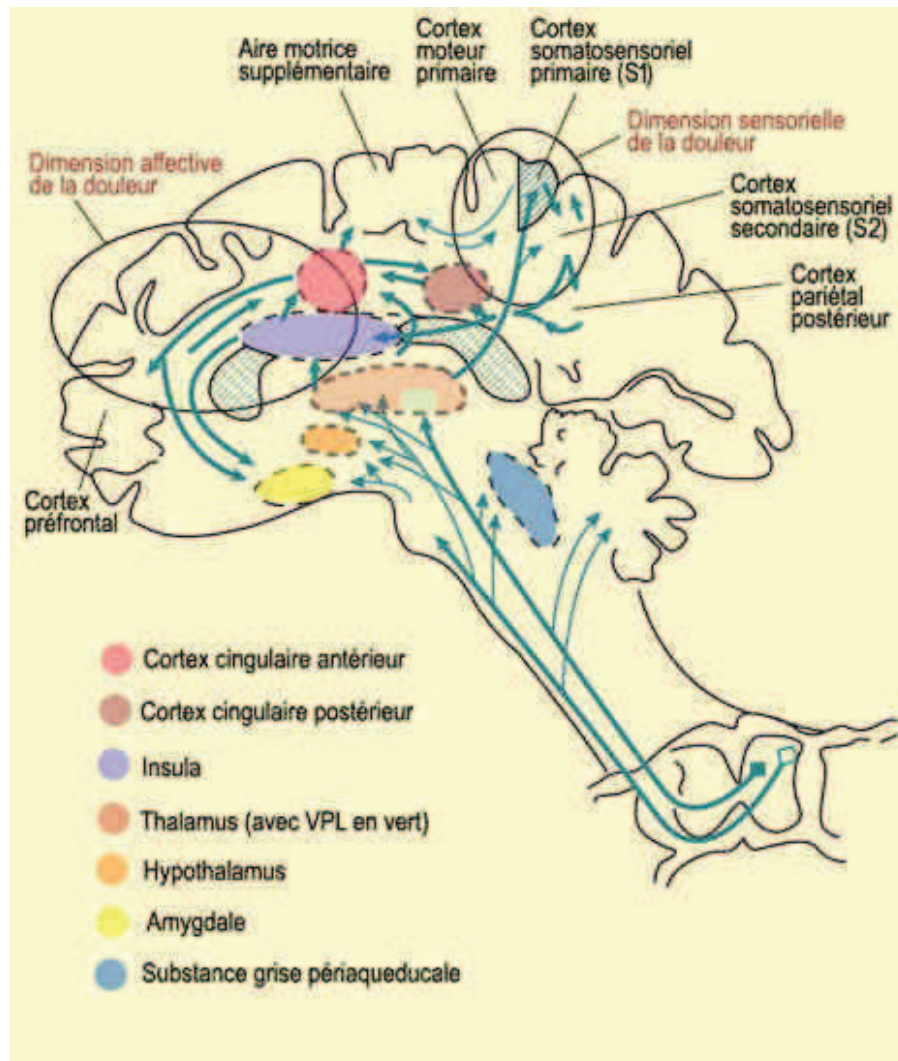


Figure 6. L'intégration supraspinale de l'information nociceptive

L'intégration de l'information nociceptive se fait par plusieurs régions du cerveau. Chacune de ces régions est associée à des sphères de perception de la douleur (en rouge). Image tirée du site internet *Le cerveau à tous les niveaux* (Dubuc, 2002a)(Copyleft).

1.2.1 Les projections spinothalamiques

Lorsque les afférences nociceptives primaires libèrent les neurotransmetteurs dans la fente synaptique, elles activent, par l'intermédiaire d'interneurones ou non, des neurones de 2^e ordre qui traversent la moelle par la commissure grise antérieure et forment la voie spinothalamique. Les axones des projections spinothalamiques forment trois funicules (Figure 7). Le premier est le

funicule médial latéral (néospinothalamique), qui provient principalement de la lame I et projette vers les régions latérales du thalamus. Le second est le funicule médial antérieur (paléospinothalamique), qui provient principalement des lames V-VII et projette vers les noyaux médians du thalamus et vers certaines structures du tronc cérébral. Le troisième est une voie multisynaptique nommée archispinothalamique qui rejoint la formation réticulée, la SPGA, les noyaux intralaminaires, le thalamus, l'hypothalamus et le système limbique. En résumé, les projections supraspinales visant la formation réticulée, le mésencéphale et le thalamus sont controlatérales au stimulus (Besson et Chaouch, 1987; Willis et Coggeshall, 1991). Les neurones du thalamus font synapse avec un neurone de 3^e ordre qui projette vers le cortex somatosensoriel et le système limbique. Les voies rejoignant les centres supérieurs permettent l'intégration de l'information sur la composante sensorielle de la douleur (localisation, durée, intensité) ainsi que la mise en place des différentes sphères de la douleur mentionnées plus tôt (Guirimand et Le Bars, 1996).

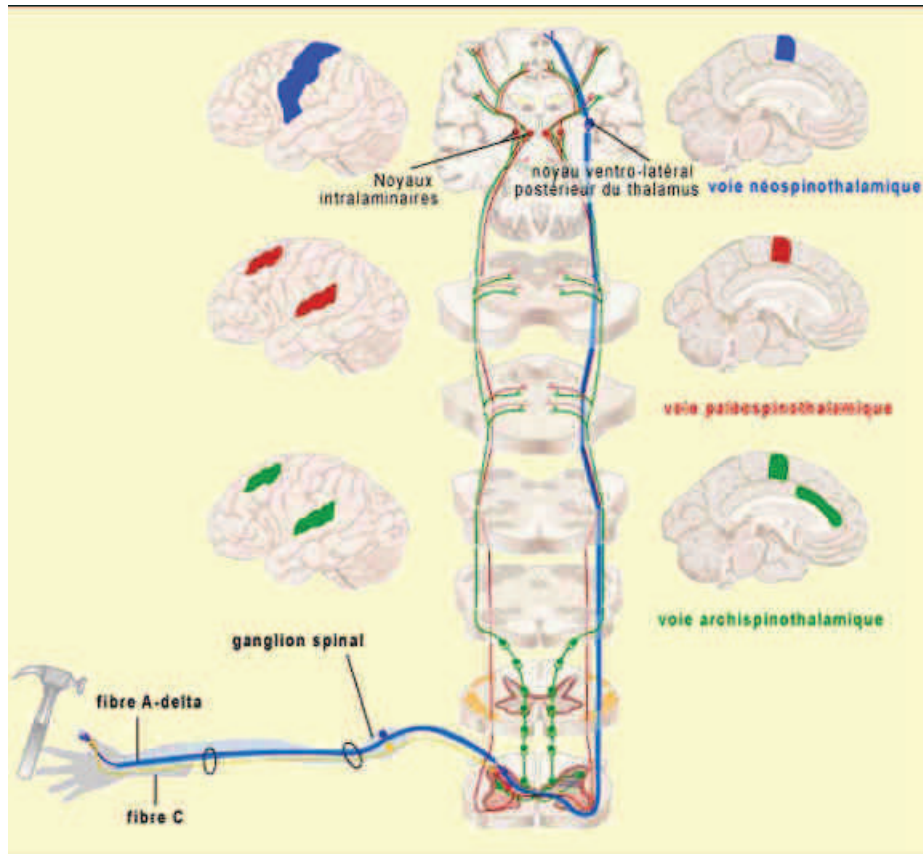


Figure 7. Les voies spinothalamiques

La transmission de l'information nociceptive se fait par trois voies dites extralémniscales. Celles-ci transportent l'information vers différentes régions du cerveau. Image tirée du site internet le cerveau à tous les niveaux. Image tirée du site internet Le cerveau à tous les niveaux, (Dubuc, 2002b) (Copyleft).

1.2.2 Les projections spinoréticulaires

Les voies spinoréticulaires, ou spinobulbaires, projettent vers quatre régions du cerveau : les groupes de cellules catécholaminergiques, le noyau parabrachial, la SGPA et la formation réticulée du tronc cérébral. Les projections spinoréticulaires sont constituées des axones des neurones de la lame I (catécholaminergiques) qui projettent vers la médulla ventromédiale, c'est-à-dire le noyau du tractus solitaire (NTS), le *locus coeruleus* et la protubérance dorsolatérale (Wall *et al.*, 2006). Ces projections sont nécessaires à l'intégration et à la régulation du système autonome. En effet, la région ventromédiale de la moelle épinière projette vers les noyaux de l'hypothalamus impliqués dans la

libération de neurotransmetteurs et de neuropeptides comme l'adrénocorticotrophine (ACTH), la vasopressine et l'ocytocine.

Les projections spinoréticulaires, particulièrement celles associées au noyau parabrachial, sont aussi nécessaires à l'homéostasie du système nerveux autonome et à la composante émotionnelle de la douleur. Ce noyau répond à la fois aux stimuli nociceptifs viscéraux et aux stimuli transmis par les neurones de la lame I (Bernard *et al.*, 1994). Entre autres, le noyau parabrachial reçoit de fortes projections du NTS (Herbert *et al.*, 1990). Ce noyau est le relais principal du nerf vague transportant l'information relative au système nerveux autonome. Les projections du noyau parabrachial se rendent principalement vers l'hypothalamus et l'amygdale, mais aussi vers la SGPA, la médulla ventrolatérale et le lit de la strie terminale (Gauriau et Bernard, 2002). La SGPA est impliquée dans différentes fonctions de régulation, tant associées à la modulation du système nerveux autonome (par des projections vers le thalamus et l'hypothalamus) qu'à la modulation de la douleur (par des projections vers la médulla rostroventrale).

Finalement, les projections spinoréticulaires vers le tronc cérébral sont initiées dans les couches profondes de la moelle épinière. Raboisson et ses collaborateurs (1996) ont démontré, par l'injection d'un traceur rétrograde, que les neurones de projection des lames V-VII innervent particulièrement le *subnucleus reticularis dorsalis* (SRD), une région dorsomédiale de la formation réticulée. Le SRD encode l'intensité des stimuli nociceptifs (Villanueva *et al.*, 1996). De plus, il a été démontré que le SRD est un élément nécessaire à l'induction du contrôle inhibiteur diffus nociceptif (CIDN) qui sera présenté plus loin (Bouhassira *et al.*, 1992b). Les neurones de cette région projettent vers le thalamus ventromédial, mais surtout vers les lames profondes (via le funicule dorsolatéral) de la moelle épinière (Villanueva *et al.*, 1995; Raboisson *et al.*, 1996; Villanueva *et al.*, 1998).

1.2.3 Les projections spinohypothalamiques

Dado et collaborateurs (1994) ont proposé l'existence d'une voie spinohypothalamique. Celle-ci serait initiée dans les lames superficielles et

profondes de la moelle épinière (I, V, VII et X) (Dado *et al.*, 1994). Cependant, peu d'études ont confirmé ces résultats.

Il est bien connu que l'hypothalamus a une influence considérable sur le système nerveux autonome (SNA) et le système sensoriel. Il a été décrit que cette région reçoit les afférences provenant des lames superficielles de la moelle épinière transportant l'information nociceptive (Giesler, 1995). D'autres études physiologiques ont aussi démontré qu'il existait une voie hypothalamique descendante rejoignant le noyau intermédiaire de la moelle épinière entre T1 et L2 permettant la modulation des fonctions autonomes et de la douleur. De plus, l'hypothalamus relie plusieurs régions du cerveau impliquées dans la modulation affective et cognitive de la douleur comme le NTS, la SGPA, la médulla rostroventrale (MRV) et des structures cortico-limbiques (Millan, 2002).

Il a d'ailleurs été suggéré que certaines situations de stress ou de douleur entraîneraient la libération d'ocytocine dans la moelle épinière par une projection directe initiée dans le noyau paraventriculaire (NPV) de l'hypothalamus (Condes-Lara *et al.*, 2006; Breton *et al.*, 2008). Ce système de projection est peu connu, mais certains de nos résultats préliminaires (Coulombe, Juif et Poisbeau, données non-publiées) démontrent l'action de l'ocytocine dans plusieurs types de mécanismes de contrôle descendants de la douleur (MCDD), dont l'analgésie induite par le stress de type opioïdergique et non opioïdergique et les CIDN.

1.3 Mécanismes de modulation de la douleur : Les voies descendantes

La douleur est une sensation qui peut être modulée par différents paramètres environnementaux (affectif, socioculturel, géographique) et physiologiques (hormones, stress, conditions pathologiques) (Calvino et Grilo, 2006). Les voies de modulation peuvent être inhibitrices ou facilitatrices. La modulation des signaux nociceptifs peut se produire à différents niveaux et peut être tonique ou déclenchée par une stimulation nociceptive (Guirimand et Le Bars, 1996).

Les mécanismes descendants de modulation de la douleur sont initiés au niveau supraspinal et projettent vers la moelle épinière. Ces projections descendent par le funicule dorsolatéral, dans le cas des influences inhibitrices, et par la partie ventrale/ventrolatérale de la moelle, dans le cas des influences facilitatrices (Zhuo et Gebhart, 1990, 1992; Urban et Gebhart, 1997; Zhuo et Gebhart, 1997; Gebhart, 2004). La SGPA est une région prédominante de la modulation de la douleur (Yaksh et Rudy, 1978). Cependant, il a été démontré que les MCDD étaient aussi produits par le cortex somatosensoriel, le thalamus, l'hypothalamus, le mésencéphale, le pons et la médulla (Yaksh et Kerr, 1986).

1.3.1 Circuit SGPA-MRV-ME

1.3.1.1 Le reseau neuronal des MCDD

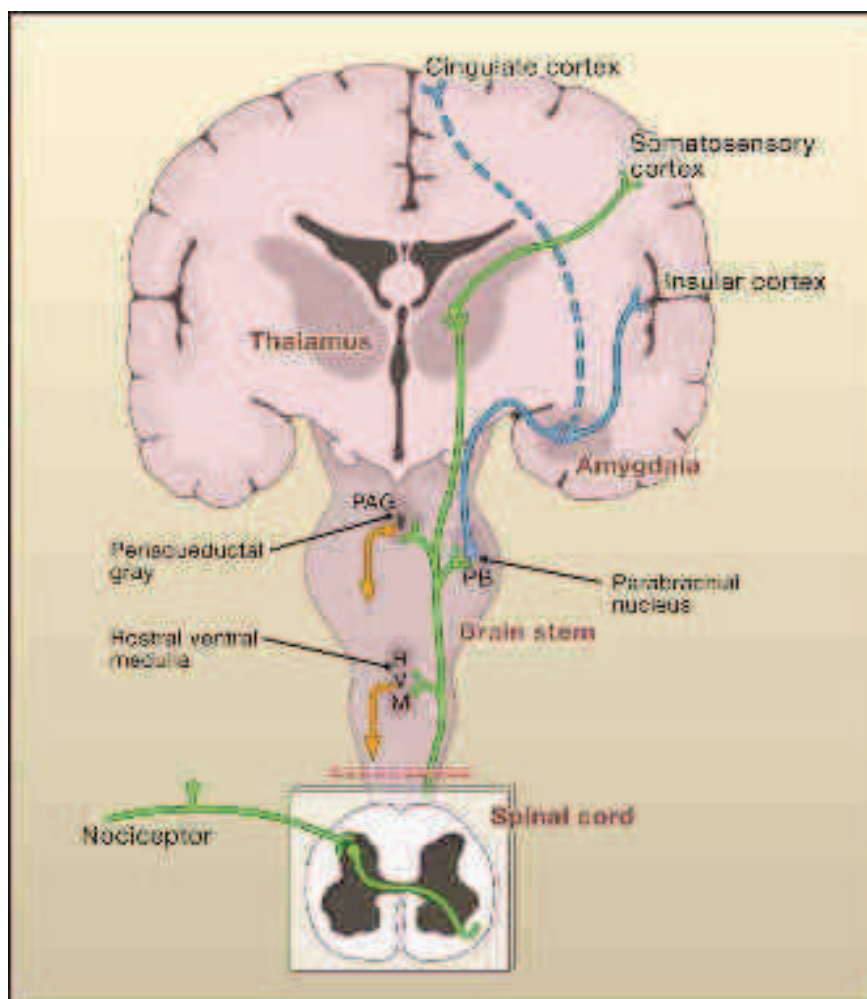


Figure 8. Vue simplifiée des systèmes ascendant et descendant de la douleur

L'information nociceptive est transmise vers différentes régions du cerveau par les voies spinothalamique, spinoréticulaire et spinohypothalamique. La douleur est modulée à différents niveaux de la moelle épinière par le cortex, le tronc cérébral, la médulla rostroventrale et la moelle épinière. Ces mécanismes de contrôle sont activés par différentes situations telles que le stress, la douleur, l'exercice physique, l'effet placebo, les émotions, les tâches cognitives. Image tirée de (Basbaum *et al.*, 2009). Droits de reproduction obtenus # 11071729.

Les projections reliant la substance grise périaqueducule, la médulla rostroventrale et la moelle épinière (SGPA-MRV-ME) sont grandement impliquées dans les MCDD (Figure 8). En effet, la stimulation électrique de SPGA produit une analgésie importante, de même que l'injection de morphine

intra-SGPA (Reynolds, 1969; Yaksh et Rudy, 1978). De plus, la lésion du funicule dorsolatéral (initié dans la MRV et projetant vers la moelle épinière) semble inhiber l'analgésie produite par les MCDD (Proudfit et Anderson, 1975; Basbaum et Fields, 1979; Mohrland et Gebhart, 1980; Proudfit, 1981). La SGPA est une région très hétérogène du tronc cérébral recevant de nombreuses afférences nociceptives provenant de la moelle épinière, mais aussi du noyau parabrachial, de l'hypothalamus, de l'amygdale et du NTS (Gray et Magnuson, 1992; Millan, 2002). En effet, elle contient une forte densité de neurones exprimant le récepteur μ opioïde, mais aussi des récepteurs GABA et glutamatergique (Gutstein *et al.*, 1998; Commons *et al.*, 1999; Commons *et al.*, 2000).

En plus de son grand nombre de projections vers la MRV, la SGPA projette aussi vers le *locus coeruleus*, la formation réticulée médullaire, le NRM, le système limbique et le noyau thalamique intralaminaire (Shah et Dostrovsky, 1980; Yeziarski *et al.*, 1982b; Eberhart *et al.*, 1985; Van Bockstaele *et al.*, 1991; Cameron *et al.*, 1995; Loyd et Murphy, 2006). Les projections du NRM libèrent de la sérotonine au niveau de la moelle épinière postérieure (Yeziarski *et al.*, 1982a; Besson, 1990), tandis que celles allant vers le *locus coeruleus* produisent une libération de noradrénaline (Brasseur *et al.*, 1997). L'inhibition des neurones de la corne dorsale de la moelle par ces voies descendantes peut se produire par la libération de différents neuromédiateurs, tels que la sérotonine et la noradrénaline, mais aussi par la libération de GABA, de glycine et de peptides opioïdes (Lin *et al.*, 1996b, 1996a, 1996c; Peng *et al.*, 1996a, 1996b, 1996c; Budai et Fields, 1998; Budai *et al.*, 1998; Cui *et al.*, 1999).

Les MCDD sont souvent définis comme étant une chaîne de cellules ON et OFF. Les cellules ON sont actives en situation de douleur (dites activatrices), tandis que les cellules OFF sont actives lorsqu'il n'y a pas de douleur (dites inhibitrices) (Wall *et al.*, 2006). Les cellules ON exprimeraient des récepteurs des opioïdes et seraient inhibées par les neurones projetant de la SGPA vers la MRV. Les cellules OFF, quant à elles, seraient excitées par les projections de la SGPA.

Les neurones descendants de la MRV vers la moelle épinière sont généralement sérotoninergiques, enképhalinergiques, GABAergiques ou glycinergiques (Fields *et al.*, 1991).

1.3.1.2 Implication des neurones gabaergiques dans les MCDD

Bien que l'on considère majoritairement l'implication des récepteurs aux opioïdes dans la SGPA, il semblerait que les interneurons GABAergiques soient aussi impliqués dans le circuit SPGA-MRV-ME. En effet, plusieurs études ont observé que l'injection d'un agoniste GABA dans le tronc cérébral induit une augmentation de la réponse à la douleur, tandis que l'injection d'un antagoniste produisait une diminution de ces réponses (Moreau et Fields, 1986; Heinricher et Kaplan, 1991; McGowan et Hammond, 1993; Gilbert et Franklin, 2001; Hasanein *et al.*, 2008). Le rôle du GABA dans ces circuits est l'inhibition des cellules OFF. L'activité des cellules OFF étant diminuée, il y a donc réduction de l'inhibition de la transmission nociceptive dans la moelle épinière. Cet effet sur les cellules OFF produit un effet pronociceptif. Cette théorie est conséquente avec le résultat observé lors de l'injection d'un agoniste du récepteur GABA_A dans la MRV (Heinricher *et al.*, 1991; Gilbert et Franklin, 2001).

Il est important de savoir qu'il n'y a pas de séparation anatomique distinguant les contrôles inhibiteurs et les contrôles facilitateurs de la douleur. Bien souvent, une même structure peut être impliquée simultanément dans l'activation des contrôles inhibiteurs et facilitateurs. De plus, un même neurotransmetteur, selon le récepteur ou le sous-type de récepteur qu'il active, pourra aussi être excitateur ou inhibiteur (Millan, 2002). L'inhibition et l'excitation par les centres supérieurs peuvent se produire à différents niveaux. En effet, l'action sur des récepteurs postsynaptiques ou l'action des afférences primaires sur certains interneurons médullaires peuvent influencer la transmission de l'information nociceptive. Finalement, l'action directe sur des récepteurs présynaptiques permet la modulation de la libération des neurotransmetteurs (Chapman et Dickenson, 1993).

1.3.2 Mécanismes spinaux

La modulation des voies afférentes de la douleur au niveau spinal est bien documentée. Tel que mentionné plus haut, un système d'interneurones excitateurs et inhibiteurs modulent l'information nociceptive à son arrivée dans la moelle épinière. Un des systèmes de contrôle inhibiteur largement discuté dans la littérature est la théorie du portillon, présenté par Melzack et Wall en 1965. Il s'agit en fait, d'interneurones de la moelle épinière contrôlant l'équilibre entre les messages nociceptifs et non nociceptifs présents dans les neurones nociceptifs non spécifiques (Melzack et Wall, 1965). Ces auteurs ont démontré que le recrutement de fibres A β permet l'activation d'interneurones inhibiteurs qui bloquent les informations nociceptives provenant d'un même segment de la moelle, produisant une inhibition localisée sur les dermatomes de cette section de la moelle.

1.3.3 Contrôle inhibiteur diffus nociceptif

Le contrôle inhibiteur diffus nociceptif (CIDN), soit l'inhibition de la douleur par un stimulus nociceptif dit conditionnant, est aussi décrit comme la modulation d'une douleur par une seconde douleur. Ce concept a été présenté pour la première fois par Le Bars, Dickenson et Besson à la fin des années 70 (Le Bars *et al.*, 1979). Par la suite, ces trois auteurs ont participé à la compréhension de ce phénomène dans leurs laboratoires respectifs. Ils ont observé qu'une stimulation nociceptive permet de recruter un système inhibiteur descendant en provenance de structures du tronc cérébral, dont la SGPA et les noyaux du raphé magnus (NRM), produisant une inhibition diffuse sur l'ensemble du corps (Le Bars *et al.*, 1979).

Ce phénomène de modulation endogène de la douleur a été décrit dans un premier temps chez l'animal par technique d'électrophysiologie *in vivo*. Le Bars et ses collaborateurs (1979) ont observé que la douleur produite par une stimulation nociceptive aiguë, dans ce cas-ci produite par des chocs électriques à une patte arrière, pouvait être inhibée (diminution des décharges de neurones convergentes) par une autre stimulation nociceptive, notamment une stimulation thermique sur la queue (Figure 9). Les neurones qui sont impliqués dans cette modulation sont ceux des voies spinothalamiques (Dickenson et Le Bars, 1983; De Broucker *et al.*,

1990). Ce phénomène se produit lorsque le stimulus conditionnant est localisé en dehors du champ réceptif de la stimulation nociceptive initiale et dépend fortement de l'intensité de cette stimulation (Le Bars *et al.*, 1981a; Villanueva et Le Bars, 1995). Ce système est sensible à de faibles doses de naloxone, impliquant donc vraisemblablement des récepteurs aux opioïdes (Kraus *et al.*, 1981; Le Bars *et al.*, 1981b). De plus, ils ont pu définir que ce système de contrôle était descendant et impliquait des régions supraspinales du système nerveux central puisque les rats spinalisés ne pouvaient pas recruter leurs CIDN (Morton *et al.*, 1988). Finalement, il semble que le SRD soit une région clé impliquée dans le CIDN animal. En effet, lorsque cette région est lésée, l'inhibition de la douleur ne peut pas être produite (Bouhassira *et al.*, 1992a; Villanueva *et al.*, 1996). Par la suite, les projections du SRD descendent vers les cornes dorsales de la moelle épinière par le funicule dorsolatéral (Villanueva *et al.*, 1986). Chez l'animal, on mesure le CIDN en utilisant une technique d'électrophysiologie *in vivo*, cependant quelques équipes ont tenté de reproduire ces résultats chez l'animal vigile (Kraus *et al.*, 1981; Morgan et Whitney, 1996).

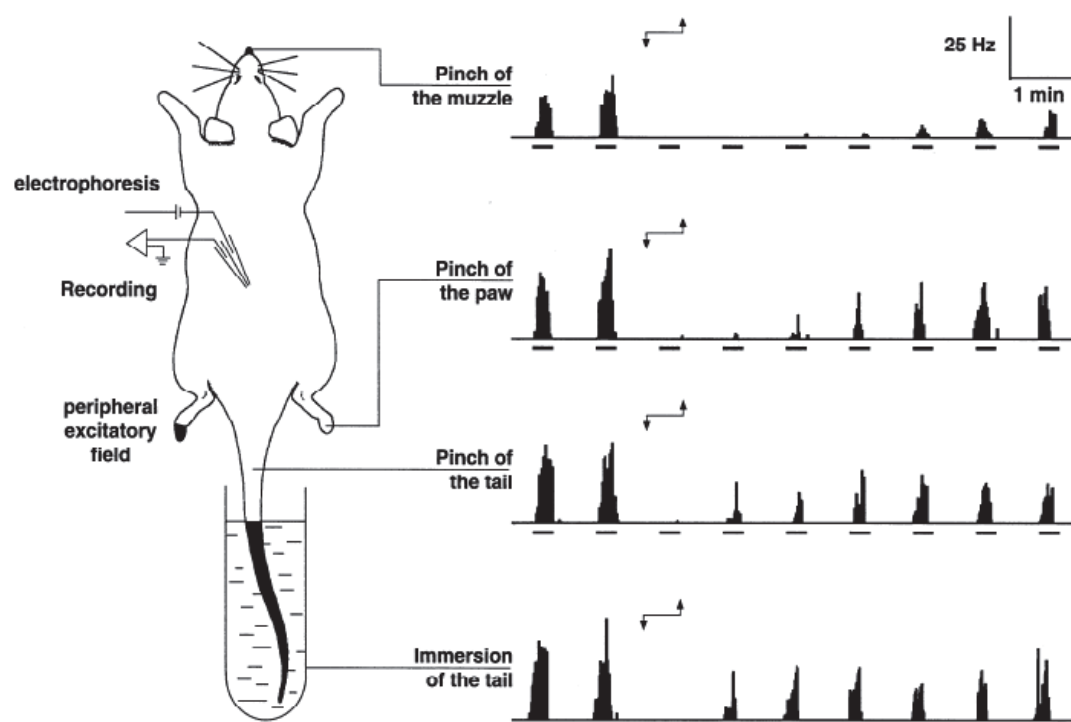


Figure 9. Observation du CIDN chez l'animal

Ce schéma représente les décharges des neurones convergents de la moelle épinière d'un rat qui sont produites par l'application de glutamate. Lors d'une stimulation nociceptive dite conditionnante, qu'elle soit produite par l'immersion de la queue dans un bain d'eau chaude ou par une stimulation mécanique de la queue, de la patte ou du museau, il y a inhibition des décharges neuronales. Ce schéma expérimental représente l'activation des CIDN. Image tirée de (Le Bars, 2002). Droits de reproduction obtenus # 11076046.

Chez l'humain, on a tenté de reproduire le phénomène du CIDN et plusieurs équipes y travaillent toujours (De Broucker *et al.*, 1990). Notamment, il est décrit que l'amplitude des CIDN dépend grandement de l'intensité et de la surface du stimulus conditionnant. Ceci est logique puisque le SRD est une région du cerveau impliquée dans l'encodage de l'intensité des stimulations nociceptives.

Il y a présentement plusieurs désaccords dans la communauté scientifique tant sur la nomenclature de ce phénomène que dans la façon de le produire. Il est évident que l'implication corticale de la perception de la douleur chez l'humain est présente en tout temps, cependant des études chez des patients avec des lésions thalamiques et des patients atteints du syndrome de Wallenberg ont démontré que ce n'est pas l'aspect douloureux ni l'aspect distrayant du stimulus conditionnant qui produit l'hypoalgésie (De Broucker *et al.*, 1990). Plusieurs auteurs ont d'importants doutes à savoir s'il s'agit réellement d'un CIDN, versus une analgésie induite par le stress, d'où la nouvelle nomenclature « modulation de la douleur par un stimulus conditionnant ». Ce terme précis définit un paradigme psychophysique lors duquel un stimulus conditionnant est utilisé afin de moduler une mesure nociceptive (Yarnitsky *et al.*, 2010). Dans cette définition, le stimulus conditionnant pourrait être nociceptif ou non nociceptif, et la modulation pourrait être soit une inhibition de la douleur ou une facilitation de la douleur. En effet, la littérature s'intéresse de plus en plus au concept de facilitation de la douleur qui pourrait aussi être une cause de douleurs chroniques chez certains patients.

Plusieurs types de stimulus conditionnants sont utilisés dans la littérature. Le plus commun est l'immersion du bras dans un bain d'eau froide. Par contre, les mesures nociceptives avant et après le stimulus conditionnant sont de modalités

multiples. Certaines équipes utilisent aussi des douleurs toniques telles que l'injection de solution saline hypertonique ou la distension du colon, cependant ces techniques sont peu communes.

Il a été montré que le CIDN diminue avec l'âge (Pud *et al.*, 2005; Larivière *et al.*, 2007; Tousignant-Laflamme *et al.*, 2008; Tousignant-Laflamme et Marchand, 2012). En ce qui concerne la différence d'amplitude du CIDN entre les hommes et les femmes, les études divergent dans leurs résultats. Toutefois, une méta-analyse des études du CIDN entre les hommes et les femmes a défini que le CIDN des hommes était plus efficace que celui des femmes (Popescu *et al.*, 2010). Plusieurs pathologies de douleurs chroniques, dont la fibromyalgie, le syndrome du colon irritable, le désordre temporomandibulaire, la névralgie du trijumeau et les céphalées de tension, démontrent une absence ou un mal fonctionnement des mécanismes endogènes de modulation de la douleur (Julien *et al.*, 2005; Pielsticker *et al.*, 2005; de Souza *et al.*, 2009; King *et al.*, 2009; Leonard *et al.*, 2009).

1.4 Modulation de la douleur par le système nerveux autonome

Le système nerveux autonome (SNA) est un système qui contrôle l'homéostasie physiologique de notre organisme. Il est nécessaire à la régulation des fonctions « automatiques » du corps humain, par exemple, la respiration, la pression artérielle, la sécrétion viscérale, et la fréquence cardiaque. Il est particulièrement sollicité lors de stress environnementaux.

Lors d'une douleur, comme dans d'autres situations de stress, le système nerveux autonome sympathique est mis en marche. En effet, la première réponse à une douleur est l'activation du système nerveux sympathique, ce qui entraîne l'augmentation de la fréquence cardiaque (Tousignant-Laflamme *et al.*, 2005; Tousignant-Laflamme *et al.*, 2006), de la pression artérielle (Davidson *et al.*, 2001; Nijssen *et al.*, 2003) et de la fréquence respiratoire (Kato *et al.*, 2001). Cette activation importante du système sympathique et des fonctions qu'il contrôle sera ensuite régulée par les systèmes physiologiques opposés (dont le système

parasympathique) afin de rétablir l'équilibre initial. On parle alors de charge allostatique qui pourrait devenir insurmontable dans certains cas pathologiques.

1.5 Modulation de la douleur par l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS)

1.5.1 Le stress et ses conséquences neuropsychologiques

Le stress est une réaction physiologique du corps à une situation qui le contraint, que celle-ci soit environnementale, physique ou psychologique. Hans Selye décrit les situations de stress comme étant composées de trois étapes successives : la réaction d'alarme, le stade de résistance et le stade d'épuisement. Le stress implique à la fois le corps et le cerveau puisqu'il implique l'hypothalamus, l'hypophyse et les glandes surrénales, d'où le nom de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS).

Lors d'un stress, il y a libération, notamment, de corticolibérine (CRH, «*corticotrophin-releasing hormone*») par les cellules parvocellulaires du noyau paraventriculaire (NPV). Le CRH est libéré dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. Cette molécule liera ses récepteurs qui sont couplés à des protéines G dans les cellules corticotropes (Grammatopoulos et Chrousos, 2002). La liaison du CRH à son récepteur produira la transcription de l'ARNm de la proopiomélanocortine (POMC) qui sera métabolisée en β -lipotropine (β -LPH), en d'adrénocorticotrophine (ACTH) et en γ -mélanotropine (γ -MSH). L'ACTH pourra être métabolisée (chez le rat, mais pas chez l'humain) en α -mélanotropine (α -MSH) et en «*Corticotrophin Like Intermediate Lobe Peptide*» (CLIP), alors que le fragment β -LPH formera le γ -LPH, la β -endorphine et la Met-enképhaline (Goodman *et al.*, 2001b; Greenspan et Gardner, 2004). La libération d'ACTH par l'hypophyse antérieure permettra, suite à sa liaison à son récepteur couplé à une protéine G, la sécrétion de glucocorticoïdes, de minéralocorticoïdes et de stéroïdes par le cortex surrénalien (Goodman *et al.*, 2001b). Une boucle de rétrocontrôle par les glucocorticoïdes de inhibera finalement la libération d'ACTH. La libération de cortisol dans le sang (cortisone chez le rongeur) permettra de moduler les

réactions du corps et du cerveau (McEwen et Kalia, 2010). Les différentes hormones libérées en situation de stress permettent l'adaptation du corps. Cependant, à long terme, la plasticité engendrée par le stress peut entraîner des effets négatifs sur le corps et les fonctions cérébrales (anxiété, trouble de l'humeur, mémoire) (Heim *et al.*, 2001).

Il est important de considérer le type de stress mis en jeu lors d'études animales et humaines. Il a été décrit notamment que les stress les plus importants étaient ceux générés par des situations inévitables (le terme *inescapable pain* est d'ailleurs repris dans l'article #1) qui se résument à une perte de contrôle personnel et individuel de la situation (Clauw, 2009). Il a été observé que certains stress, souvent considérés comme mineurs, peuvent être associés au développement de pathologies douloureuses. On parle notamment d'intimidation, de situation ne permettant pas de prise de décision, ou de surplus de travail important. Ces types de stress sont souvent autogénérés par les personnalités perfectionnistes, un don de soi trop important et un surengagement personnel (Kivimaki *et al.*, 2004; Van Houdenhove et Luyten, 2006).

Dans ces situations, le corps doit maintenir l'homéostasie de son milieu intérieur. Celui-ci utilise des méthodes d'allostasie, c'est-à-dire un processus ramenant un organisme à son équilibre physiologique interne (Sterling et Eyer, 1988). Les situations de stress peuvent déréguler ces processus de maintien de l'équilibre et créer une situation de détresse engendrant des conditions pathologiques telles que la dépression, l'anxiété, l'inflammation (Clark *et al.*, 1997; Peters et McEwen, 2012). L'allostasie implique plusieurs systèmes de contrôle des fonctions physiologiques comme l'axe HHS, le système nerveux autonome et le système immunitaire. Leurs fonctions sont principalement de réagir aux situations stressantes de l'environnement. Les propriétés d'une allostasie suffisante, par exemple dans un système non pathologique, consistent en une bonne capacité à s'activer en situation de stress et à se désactiver le moment venu.

Lors d'un évènement majeur, dépendamment des différences individuelles et de la réponse comportementale à la situation, il y aura une réponse physiologique produit par le corps. Cette réponse, l'allostasie, permettra l'adaptation à cette situation. Lorsque le corps ne peut plus s'adapter, il y a ce qu'on appelle une surcharge allostatique (McEwen, 2007). Quatre types de surcharge allostatique peuvent se présenter (McEwen, 2007). Premièrement, une surcharge allostatique peut se développer en réaction à de nombreux stress répétés provenant de différentes sources. Deuxièmement, il peut y avoir un manque d'adaptation lors d'un stress prolongé. Troisièmement, il peut y avoir une absence de récupération suivant une situation stressante. Finalement, une surcharge allostatique peut se traduire par une absence totale ou inadéquate de réaction physiologique en réponse à un évènement. Ces dérèglements de la réponse physiologique se traduisent par une augmentation ou une diminution des médiateurs impliqués dans le stress. Cela entraîne nécessairement des mécanismes de compensation par d'autres médiateurs produisant les symptômes associés à la surcharge allostatique tels que la mauvaise qualité du sommeil, les troubles cognitifs, l'irritabilité, l'anxiété et la dépression (McEwen, 2007).

L'implication du stress dans les pathologies douloureuses a été décrit par quelques études, notamment celles qui s'intéressent au syndrome de fatigue chronique et à la fibromyalgie (Crofford *et al.*, 1994; Neeck et Crofford, 2000; Harris, 2010). Ces syndromes suggèrent une influence des corticostéroïdes et du glutamate dans l'insula des patients atteints de conditions de douleur chronique (Harris, 2010)

Les corticostéroïdes libérés pendant le stress sont également des molécules utilisées depuis plusieurs décennies dans le traitement de la douleur (McEwen et Kalia, 2010). Ils sont reconnus pour diminuer l'inflammation, mais aussi pour inhiber l'expression des neuropeptides impliqués dans la transmission de la douleur dans la moelle épinière (Pinto-Ribeiro *et al.*, 2009). Un stress important entraîne une analgésie (généralement nommée analgésie induite par le stress (*stress-induced analgesia*), tandis qu'un stress léger produit plutôt une

hyperalgésie (Butler et Finn, 2009; Devall *et al.*, 2009). Cependant, les effets de la chronicité d'un stress sont moins bien caractérisés. Certaines expérimentations animales ont montré que l'exposition répétée à un stress pouvait produire une hyperalgésie (Imbe *et al.*, 2006; Senba *et al.*, 2008).

1.5.2 Analgésie induite par le stress

L'analgésie induite par le stress (AIS) est l'une des résultantes de la libération hormonale par l'axe HHS qui permet à l'être qui subit le stress de fuir même en situation de blessures. Les molécules impliquées dans ce phénomène sont les hormones de l'axe HHS, les neurotransmetteurs monoaminergiques et les opioïdes endogènes (Lewis *et al.*, 1982; MacLennan *et al.*, 1982; Watkins *et al.*, 1984). L'étude de l'AIS a été faite chez plusieurs modèles animaux. Il a été déterminé très tôt que l'AIS varie grandement selon l'espèce animale, le sexe et le type de stimulus utilisé. Dès le début des années 80, les chercheurs ont commencé à décrire des AIS sensibles à la naloxone (AIS dite opioïdergique) et insensibles à la naloxone (AIS dite non opioïdergique) (Spiaggia *et al.*, 1979; O'Connor et Chipkin, 1984).

Par exemple, O'Connor et Chipkin (1984) ont démontré, chez la souris, que l'AIS produite par une nage forcée à 2°C pendant 2 minutes, mesurée par le test du retrait de la queue, était inchangée suite à l'injection de naloxone, de même qu'à l'injection d'un inhibiteur de l'enképhalinase thiorphane. Par contre, l'analgésie produite par une nage forcée de 3 minutes à 32°C était sensible à l'injection de naloxone. Ces expérimentations ont soulevé, d'une part, la notion d'AIS opioïdergique et non opioïdergique, mais soulignent aussi l'importance de la nature du stress sur les mécanismes neurophysiologiques impliqués et sur l'issue comportementale. Cet exemple montre bien qu'un stress important sera de type non opioïdergique alors qu'un moins important sera de type opioïdergique. Il est important de mentionner ici, pour faire référence à l'effet du stress sur la douleur décrit en 1.5.1, que les stress de nage forcée sont en tout temps des stress produisant de l'analgésie. Un exemple de stress léger produisant une hyperalgésie serait notamment celui induit par une plaque vibrante (Devall *et al.*, 2009). En

effet, il a été démontré que le positionnement d'un rat sur une plaque qui vibre pendant 5 minutes diminuait le seuil nociceptif au test de retrait de la queue (hyperalgésie).

Les premières études qui ont démontré l'implication des récepteurs NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique) dans le mécanisme d'AIS ont été faites par le groupe de Liebeskind au début des années 90. Cette équipe a étudié le rôle des récepteurs opioïdes et des récepteurs NMDA du glutamate dans les AIS produites par la nage forcée. Plusieurs modèles de souris ont été utilisés afin de prouver leur point : des souris déficientes pour les récepteurs aux opioïdes (CXBK), des souris riches en récepteurs opioïdes (CXBH), puis des souris sélectionnées pour avoir une faible (LA) ou une forte (HA) AIS. Ce groupe a défini qu'en fonction du type de stimulus, l'analgésie pouvait être non opioïdérique (3 minutes à 15°C), mixte (3 minutes à 20°C) ou opioïdérique (3 minutes à 32°C). De plus, ils ont démontré que la composante opioïdérique est inhibée par la naloxone et que la composante non opioïdérique est inhibée par le MK-801, un antagoniste du récepteur NMDA. Ces observations ont été validées lors de douleurs induites par la plaque chaude, mais aussi induites par l'injection de formaline (Marek *et al.*, 1991; Marek *et al.*, 1992; Vaccarino *et al.*, 1992).

1.6 Modulation de la douleur par la gestion émotionnelle et la personnalité

La perception de la douleur peut aussi être modulée par de nombreux facteurs psychologiques comme la personnalité et la gestion émotionnelle. La personnalité est définie par l'Association Américaine de Psychologie comme étant l'ensemble des différences caractéristiques d'un individu dans sa façon de penser, de se comporter et de se sentir (American Psychological Association, 2013). La personnalité influencera grandement la façon de réagir d'un individu à une situation particulière (problème, stress, prise de décision). Plusieurs auteurs ont tenté de définir la personnalité en fonction de différentes approches et théories.

L'approche psychobiologique de Cloninger sépare la personnalité en caractères et en tempéraments. Le caractère est une dimension de la personnalité

déterminée par l'apprentissage social et l'apprentissage cognitif d'une personne. Celui-ci se développe en fonction des différentes interactions sociales et par les expériences de vie (Hansenne, 2001). Le tempérament est plutôt la tendance naturelle d'un individu à activer, à inhiber ou à maintenir un comportement. Le tempérament est plutôt décrit comme un facteur inné (Hansenne, 2001). Cloninger justifie les tempéraments (recherche de nouveauté, évitement du danger, dépendance à la récompense et persistance) par des différences de concentration des neurotransmetteurs du cerveau. Il décrit la recherche de nouveauté par un état d'activation des comportements. Les personnes ayant un haut score à ce tempérament recherchent activement des sensations fortes, sont plutôt extravagantes et désordonnées. Ce comportement serait vraisemblablement dû à de faibles niveaux de dopamine, ce qui fait que ces personnes seront à la recherche de situations entraînant sa libération (Beninger, 1983; Tomer et Aharon-Peretz, 2004; Kazantseva *et al.*, 2009; Nyman *et al.*, 2009; Athanasoulia *et al.*, 2012). L'évitement du danger est un tempérament d'inhibition du comportement. Il s'agit généralement de personnes très timides, qui ont peur des situations nouvelles, qui sont souvent inquiètes et pessimistes, et qui auraient de faibles niveaux de sérotonine (Hansenne et Anseau, 1999; Pelissolo et Corruble, 2002; Serretti *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007). Finalement, la dépendance à la récompense est un maintien du comportement qui s'applique à certaines personnes qui recherchent fortement l'approbation sociale, la récompense et qui sont souvent des personnes très sentimentales et émotionnelles. Ces comportements sont souvent associés à la présence de noradrénaline (Garvey *et al.*, 1996; Curtin *et al.*, 1997).

Ceci étant dit, la personnalité et la gestion émotionnelle peuvent grandement influencer la perception de la douleur. Ce lien est particulièrement identifiable puisque les régions cérébrales et les neurotransmetteurs impliqués dans la personnalité et les émotions sont similaires à ceux impliqués dans la transmission et la modulation de la douleur, par exemple, le cortex cingulaire antérieur est souvent associé à des fonctions liées aux émotions (résolution de conflits, colère), mais est aussi une des structures impliquées dans l'expérience subjective de la douleur (Apkarian *et al.*, 2005; Beckmann *et al.*, 2009; Denson *et*

al., 2009). Dépendamment de leur importance de ces émotions chez un individu, cela permettra une modulation plus ou moins importante de la douleur (Rhudy et Meagher, 2000).

Plus précisément, certains traits de personnalité, tels que l'évitement du danger, possèdent une relation directe avec la perception de la douleur. L'évitement du danger est associé à l'anxiété d'anticipation, la peur de l'incertitude, la timidité, et la fatigabilité/asthénie (Cloninger *et al.*, 1993). Il a été démontré que la peur diminue la douleur alors que l'anxiété l'augmente chez l'humain (Rhudy et Meagher, 2000). Cette relation a d'ailleurs été adressée dans une étude utilisant l'imagerie cérébrale. Ochsner et collaborateurs (2006) ont déterminé que la peur et l'anxiété associées à la douleur implique à la fois le cortex préfrontal médial et le cortex orbitofrontal latéral (Ochsner *et al.*, 2006). La peur est une situation émotionnelle de stress. D'ailleurs, l'analgésie résultante de la peur est souvent étroitement liée à une analgésie induite par le stress (Rhudy et Meagher, 2000). L'anxiété est un état psychologique distinct qui s'oriente et se définit davantage par rapport à l'anticipation du futur. Cette anticipation entraîne un état d'hypervigilance et résulte en une augmentation de la saillance cognitive. L'hyperalgésie associée à cet état pourrait être due à cette hypervigilance qui rend plus attentif aux sensations et donc plus sensible à la douleur (Barlow *et al.*, 1996). La notion d'évitement du danger est aussi associée à l'amplitude de la réponse nociceptive expérimentale, notamment on observe une corrélation négative avec le seuil de douleur chez des sujets sains. Ce résultat est en complet accord avec la théorie mentionnée précédemment puisqu'une forte anxiété liée au tempérament d'évitement du danger diminue le seuil de douleur chez ces personnes. De plus, il a été suggéré que l'évitement du danger serait un trait prédisant d'une plus grande réponse à la douleur et permettrait aussi de prédire l'analgésie produite par la morphine (Pud *et al.*, 2004; Pud *et al.*, 2006). D'ailleurs, ce postulat peut aussi être transposé à certaines pathologies de douleurs chroniques. En effet, il a été observé que les femmes souffrant de migraine ont des scores d'évitement du danger et de persistance plus élevés, ainsi qu'un score d'auto-détermination plus faible que les sujets sains (Mongini *et al.*, 2005).

Dans le même ordre d'idée, Applegate et ses collaborateurs (2005) se sont intéressés au lien existant entre la personnalité et la prédisposition à développer des pathologies de douleurs chroniques. Quatre-mille-neuf-cent-quatre-vingt-cinq participants ayant répondu au «*Minnesota Multiphasic Personality Inventory*» (MMPI) à leur entrée à l'université entre 1964 et 1966 ont été recrutés pour participer à une étude longitudinale sur l'influence de la personnalité comme prédicateur de la santé. En 1997, ces participants ont répondu à différents questionnaires permettant d'établir leurs conditions douloureuses (n = 2332). Les auteurs ont pu observer une corrélation entre les échelles d'hystérie et d'hypocondrie du MMPI et le nombre de conditions douloureuses chez ces sujets en milieu de vie. Un résultat très intéressant est que, chez les hommes, un haut score de l'échelle de masculinité-féminité (faible score étant davantage masculin et un haut score davantage féminin) est prédictif de l'apparition de douleurs chroniques en milieu de vie. Les auteurs soulèvent par contre la relation évidente entre les scores de féminité de l'échelle de masculinité-féminité et les mesures d'anxiété, qui comme mentionné plus haut, est en lien direct avec l'apparition de douleur chronique (Applegate *et al.*, 2005). Chez la femme, le score de paranoïa est aussi associé à l'apparition de douleur chronique, ce qui n'est pas présent chez l'homme.

Un autre facteur émotionnel largement étudié chez les populations souffrant de douleur chronique est le concept de « catastrophisation » (Hsieh *et al.*, 2010; Sullivan *et al.*, 2011). Le livre « La thérapie cognitive et les troubles émotionnels » décrit ce concept comme ceci: « La catastrophisation a ceci de caractéristique que le sujet établit une équation entre l'hypothèse et la réalité. Il prétend qu'une situation dans laquelle il existe une éventuelle possibilité de danger, constitue un danger réel, hautement probable » (Beck, 2010). En d'autre terme, il s'agit d'une émotion négative mettant l'emphase et exagérant l'impact d'une douleur. Le livre « Psychologie de la santé - A Textbook » décrit « la catastrophisation comme impliquant trois composantes : 1. La rumination : une focalisation sur l'information menaçante à la fois interne et externe [...] ; 2. La

magnification : surévaluer l'étendue de la menace [...] ; 3. L'impuissance : sous-estimer les ressources personnelles et environnementales qui peuvent atténuer le danger et les conséquences désastreuses [...] » (Ogden *et al.*, 2008). Cette « catastrophisation » a pour résultante une augmentation des douleurs et de leur intensité. Il est décrit que les femmes ont davantage tendance à avoir des pensées « catastrophisantes » que les hommes et que cette relation est particulièrement associée au genre (Sullivan, 1995; Keefe *et al.*, 2000; Thorn *et al.*, 2004). En effet, cette étude stipule notamment que la « catastrophisation » expliquerait l'effet du genre sur la douleur. Cette différence serait associée à des divergences au niveau de l'apprentissage social chez ces individus. Finalement, la notion de « catastrophisation » serait grandement influencée par la dépression.

Une étude faite en 2009 s'est intéressée à la relation entre la douleur et la dépression chez les patients atteints d'arthrite inflammatoire. Ils ont observé que les symptômes de dépression et de douleur corrélaient ensemble au début de l'étude. De plus, les symptômes de dépression sont un bon prédicateur de l'importance des douleurs évaluées par le «*McGill Pain Questionnaire*» six mois plus tard (Schieir *et al.*, 2009). Cependant, il est important de faire la distinction entre l'humeur dépressive des sujets sains ou atteints de douleurs chroniques et les patients présentant une dépression majeure. Il est évident qu'un humeur dépressif affectera son état général d'un sujet, autant d'un point de vue physique, socioprofessionnel que personnel. Ces aspects influencent grandement la perception et l'interprétation de la douleur de ces patients (Strigo *et al.*, 2008). Lorsque l'on parle de douleurs expérimentales, il est vrai que la perception de la douleur est altérée par un trouble de dépression majeure. Par contre, la direction vers laquelle la douleur est modifiée varie beaucoup sur le plan expérimental et dépend grandement de la modalité de la douleur utilisée (Bar *et al.*, 2005).

La dépression corrèle fortement avec certains traits de personnalité (Hansenne et Ansseau, 1999; Hansenne *et al.*, 1999), mais aussi avec le neuroticisme décrit par le *NEO-Five* (test de personnalité développé par Costa et McCrae, dérivé du *BIG-Five*, et évaluant le neuroticisme, l'extraversion,

l'ouverture à de nouvelles expériences, l'amabilité et la méticulosité). Le neuroticisme est un trait de personnalité reflétant le degré d'instabilité émotionnel d'une personne (Lyoo *et al.*, 1998). Il inclut notamment certaines facettes telles que l'anxiété, l'hostilité, la dépression, la conscience personnelle, l'impulsivité et la vulnérabilité au stress et est aussi associé au développement et à l'importance des douleurs chroniques (McCrae et John, 1992). Il est décrit que les patients dépressifs présentent aussi un tempérament d'évitement du danger plus élevé et un score d'autodétermination plus faible que les sujets sains (Hansenne et Bianchi, 2009). Finalement, il a été observé que les sujets ayant une personnalité dépressive présentent un tempérament de recherche de nouveauté diminué, de même que pour l'extraversion et les mécanismes de défense adaptatifs (Lyoo *et al.*, 1998).

Une étude faite en 2004 par Ramirez-Maestre et ses collaborateurs a montré que la gestion de la douleur par des stratégies actives est différente entre les hommes et les femmes. Les hommes sembleraient utiliser davantage de stratégies de gestion de la douleur en comparaison des femmes. L'utilisation de ces stratégies corrèle d'ailleurs avec la perception de la douleur (Ramirez-Maestre *et al.*, 2004). La retombée de cette observation est particulièrement intéressante puisque les stratégies de gestion de la douleur diminuent la détresse générale associée à une situation douloureuse (Esteve *et al.*, 2007).

1.7 La fibromyalgie

La fibromyalgie est une pathologie présentant de multiples symptômes et qui se caractérise par la présence de douleurs chroniques musculosquelettiques diffuses dans le corps. Ces douleurs sont décrites principalement par des symptômes d'hyperalgésie et d'allodynie (Moshiree *et al.*, 2007). Les douleurs des patients fibromyalgiques sont généralement localisées dans les muscles, les tendons et les ligaments. Les autres symptômes associés à la fibromyalgie sont : la présence de fatigue importante, une dysfonction cognitive, de la difficulté à dormir et des épisodes de dépression (Bennett *et al.*, 2007). De plus, cette pathologie est souvent associée à un syndrome de fatigue chronique, au syndrome

du côlon irritable, à des désordres temporomandibulaires et à des cystites interstitielles (Clauw, 2009).

Le Collège américain de Rhumatologie a défini, en 1990, les critères diagnostiques de la fibromyalgie. À cette époque, le diagnostic était fait en présence de douleurs diffuses chroniques dans les quatre quadrants du corps jumelée à l'observation d'au moins 11 points de pression douloureux sur 18 (Wolfe *et al.*, 1990). En 2010, ces critères ont été revus puisqu'ils avaient davantage été conçus pour la standardisation de la recherche et non comme un outil diagnostique. En effet, ces points de pression ne sont pas une mesure suffisante pour le diagnostic de la pathologie puisque celle-ci est de loin plus complexe et inclut de multiples symptômes (Clauw, 2009). Il a été suggéré que la mesure quantitative de la douleur par l'index de douleurs diffuses (WPI, «*Widespread Pain Index*») et l'évaluation des différents symptômes clés de la pathologie sont de meilleurs outils diagnostiques chez cette population de sujet (Wolfe, 2010; Wolfe *et al.*, 2010). Puisqu'aucune cause physiologique (lésions, inflammation) n'a été observée chez ces patients, les chercheurs se tournent maintenant vers l'exploration d'autres causes, particulièrement associées à des dysfonctions au niveau du système nerveux central.

La fibromyalgie, qui affecte environ 1% des Canadiens, survient généralement à la suite d'un évènement déclencheur de nature traumatique, physiologique ou psychologique. Par exemple, la pathologie peut apparaître suivant un épisode de douleur aiguë/chronique, une infection, un traumatisme physique, une altération hormonale (produite par un cancer ou par le dysfonctionnement d'une glande), la consommation de drogue, ou un stress psychologique associé à des catastrophes ou à une détresse psychologique (Clauw, 2009). La fibromyalgie possède aussi une certaine composante génétique. Ces théories ont été confirmées par des études gémellologiques (Kato *et al.*, 2006). Certains généticiens ont pu démontrer que les sujets fibromyalgiques possédaient souvent un polymorphisme pour les gènes encodant le récepteur 5HT_{2A}, la protéine de transport de la sérotonine, le récepteur D4 de la dopamine, et la

catéchol-O-méthyltransférase (Bondy *et al.*, 1999; Offenbaecher *et al.*, 1999; Buskila *et al.*, 2004). De façon globale, un dysfonctionnement monoaminergique est fortement suggéré dans cette pathologie. En effet, des niveaux faibles de sérotonine sont souvent présents chez les sujets fibromyalgiques et sont associés à un faible métabolisme de la sérotonine (Russell, 1996). Dans le même ordre d'idée, les niveaux cérébraux de substance P sont augmentés chez ces sujets (Pillemer *et al.*, 1997) et la met-enképhaline est diminuée (Russell, 1996). Ces variations sont logiques considérant que le niveau de substance P et de met-enképhaline est régulé par la sérotonine.

L'intégrité et la réactivité de l'axe HHS chez les sujets atteints de fibromyalgie ont été largement étudiées considérant le rôle du stress dans l'instauration de la pathologie. En effet, plusieurs équipes ont observé un manque de réactivité de l'axe HHS chez ces sujets. La réactivité de l'axe HHS a été étudié lors de différentes situations de stress, qu'ils soient produits par une injection d'hormone, une hypoglycémie ou l'injection de dexaméthasone (Crofford *et al.*, 1996; Riedel *et al.*, 1998). Dans tous les cas, il y a une augmentation de la libération d'ACTH et une diminution de la libération de cortisol chez ces sujets. De plus, il est souvent observé que le système nerveux sympathique des patients fibromyalgiques ne s'active pas normalement en situation de stress (Sarzi-Puttini *et al.*, 2006). On parle d'ailleurs de rigidité du SNA chez ces sujets (Martinez-Lavin, 2012).

2. Le rôle des stéroïdes et des neurostéroïdes dans les mécanismes de transmission et de modulation de la douleur chez les hommes et les femmes

Les hommes et les femmes ont une relation très différente avec la douleur. Le Pr Mogil (Mogil, 2012) écrivait récemment que plusieurs raisons peuvent expliquer la prévalence plus élevée de conditions de douleurs chroniques chez les femmes. En effet, il soulève la possibilité que les femmes demandent de l'aide plus facilement auprès des institutions de soins et soient plus ouvertes à parler de leurs malaises, douleurs et souffrances. Il est aussi possible que les femmes aient une prédisposition qui la rend plus susceptible au développement de pathologies de douleurs. Finalement, il est possible que les femmes, qui présentent des seuils de douleur plus faible et une tolérance moins grande à la douleur ce qui les rend plus propice à souscrire aux critères diagnostiques des pathologies de douleur chroniques.

La douleur peut être influencée par différentes sphères sensorielles, affectives et motivationnelles. Elle peut aussi être modulée par différents facteurs biologiques, dont une pléthore de neuropeptides, d'hormones, de neurotransmetteurs. Ces facteurs sont également à même de recruter une multitude de circuits d'activation, de boucles de rétrocontrôle, autant par des systèmes périphériques que par des mécanismes centraux. Un grand intérêt a été porté aux rôles des hormones sexuelles dans les mécanismes de transmission et de modulation de la douleur. Cependant, les facteurs psychologiques, socioculturels et le vécu d'une personne (*i.e.* son histoire personnelle avec la douleur) ne peuvent être sous-estimés, de même que les comportements éthologiques intrinsèques à l'être humain. Ces traces laissées par l'évolution peuvent être repoussées au second plan, mais ne peuvent clairement pas être ignorées.

2.1 L'action des stéroïdes et des neurostéroïdes dans le système nerveux central

2.1.1 Les hormones stéroïdiennes et leurs métabolites neuroactifs

Les hormones sont des molécules sécrétées par une glande (ou des cellules) endocrine dans la circulation sanguine et qui agissent à distance en réponse à une stimulation. Les hormones sont transportées par le sang, généralement liées à une molécule de transport, ou bien de façon libre jusqu'à l'organe cible. Ces substances modulent la mise en place et le fonctionnement du corps entier, y compris le système nerveux central, où elles régulent particulièrement le comportement, les fonctions cognitives, l'humeur, l'appétit, l'apprentissage, la mémoire et les activités sexuelles. Les hormones synthétisées et sécrétées par les cellules du système nerveux (les neurohormones) sont libérées comme des neurotransmetteurs ou des neuropeptides, dans le sang ou dans les espaces interstitiels, pour exercer leur action (Goodman *et al.*, 2001a; Greenspan et Gardner, 2004). À ce niveau les hormones/neurohormones peuvent avoir des effets autocrines et paracrines. Un fait intéressant est que certains stéroïdes n'ont pas besoin d'être libéré par le neurone pour avoir un effet puisque le site de liaison à certains récepteurs se situe à l'intérieur de la membrane plasmatique.

Les principales hormones stéroïdiennes présentes dans le corps sont les stéroïdes sexuels (androgènes, estrogènes, progestérone), les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes. Les gonades sont la source principale de synthèse des stéroïdes sexuels (hormones gonadiques), cependant ils peuvent aussi être synthétisés par les glandes surrénales et par les cellules du système nerveux (neurones, astrocytes, glies). On les appelle alors neurostéroïdes, car ils sont produits également en absence de gonades et de surrénales (Baulieu, 1998; Greenspan et Gardner, 2004). Ces stéroïdes possèdent tous une structure de base composée de quatre anneaux et qui est synthétisée à partir du cholestérol (Greenspan et Gardner, 2004) (Figure 10). On les trouve à la fois chez l'homme et chez la femme, mais à des concentrations différentes (Greenspan et Gardner, 2004).

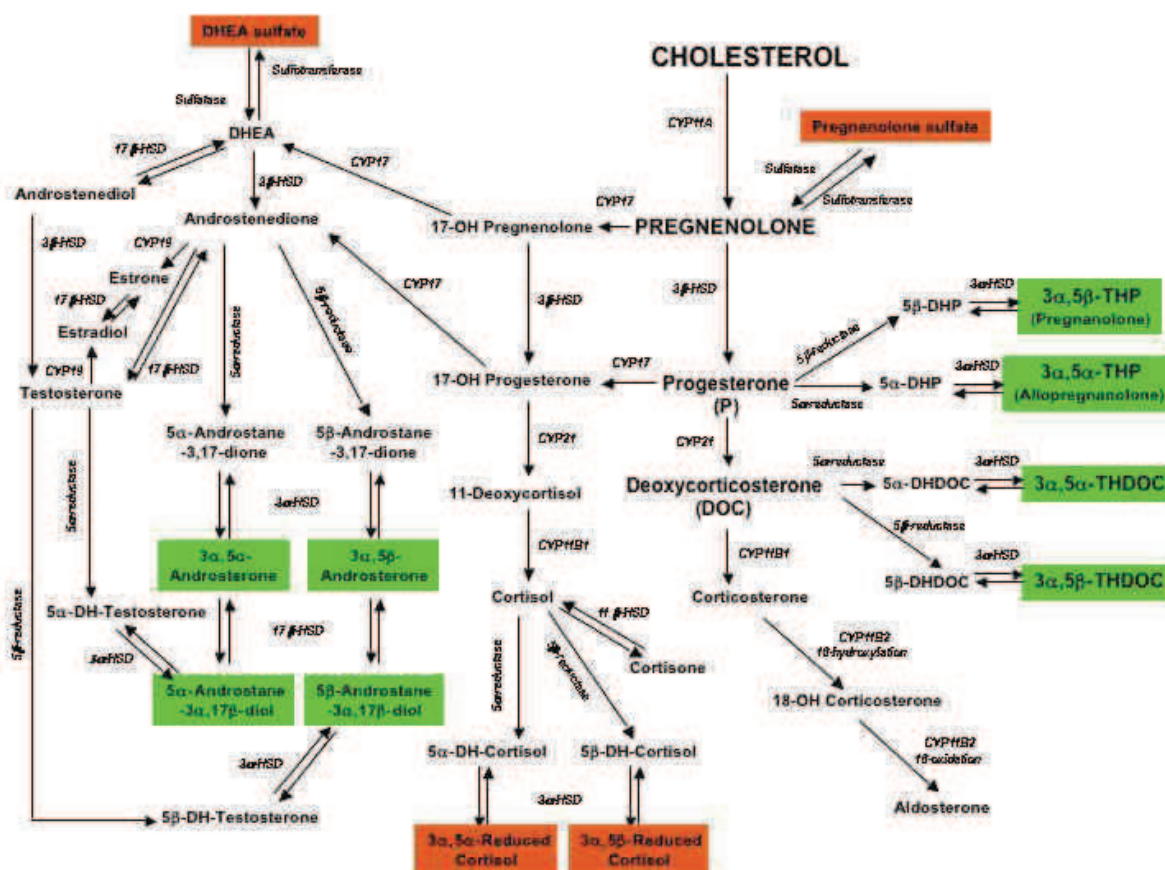


Figure 10. Schéma de synthèse des hormones stéroïdiennes par les glandes surrénales

Représentation schématique et simplifiée de la voie de synthèse des hormones stéroïdiennes par les glandes surrénales. Schéma tiré de (Morrow, 2007). Droits de reproduction obtenus #11105325..

L'action des stéroïdes dans le système nerveux central peut être effectuée de différentes façons, soit par des effets « génomiques » et « non génomiques » (McEwen, 1991) (Figure 11). Classiquement, les stéroïdes produisent leurs effets par leur liaison à un récepteur nucléaire (Evans, 1988; Beato, 1989; Zinder et Dar, 1999). Ce mécanisme d'action est généralement appelé « génomique » puisque la liaison au récepteur nucléaire permet la régulation de la transcription des gènes (Zinder et Dar, 1999). De plus, puisque la modification de l'expression génique peut prendre de quelques minutes à quelques heures, elle est souvent appelée action à long terme (McEwen, 1991). Cependant, l'effet des stéroïdes peut aussi passer par leur liaison à des récepteurs membranaires ou à des canaux ioniques (Smith *et al.*, 1987; Rupprecht et Holsboer, 1999; Schlichter *et al.*, 2006). Les mécanismes d'action associés à ces récepteurs membranaires sont souvent couplés à des protéines G (GPCR), permettant la transduction de l'information par une cascade intracellulaire de signalisation qui a la capacité de moduler l'excitabilité cellulaire ou de moduler l'expression de certains gènes (AP1, c-fos/jun, c-myc) (Wehling, 1997; Goodman *et al.*, 2001a; Cornil *et al.*, 2006). Ces effets associés à des récepteurs membranaires sont parfois nommés « génomiques indirects » ou « ionotropiques ». Ces derniers sont contrôlés par des récepteurs de type métabotropiques ou ionotropiques. Ils sont nommés ainsi puisque la modulation de la transcription des gènes n'est pas engendrée directement par le récepteur, mais bien par les cascades intracellulaires qui sont mises en jeu suivant la liaison du ligand au récepteur. Cependant, plusieurs auteurs appellent aussi ce type d'activation « non génomique » à l'opposé des effets « génomiques » produits par la liaison aux récepteurs nucléaires. Ces mécanismes d'action des stéroïdes par les GPCR ou les canaux ioniques produisent leurs effets très rapidement, de quelques secondes à quelques minutes, donc souvent nommés l'action rapide des stéroïdes (McEwen, 1991, 1994). Ces effets rapides sont généralement observés dans le système nerveux central et très peu en périphérie (Ke et Ramirez, 1990). Finalement, certains stéroïdes présentent des caractéristiques antioxydantes associées à leurs structures chimiques qui octroient des propriétés neuroprotectrices par la régulation de la concentration des radicaux libres (Behl *et al.*, 1997). Ces effets, dépendamment des auteurs, peuvent être appelés « non

génomiques ». Cependant, une grande partie de la littérature ne la prend pas en compte et définit l'action « non génomique » comme celle impliquant l'activation de récepteurs membranaires, métabotropiques ou ionotropiques, l'action « génomique » étant réservée aux récepteurs nucléaires (McEwen, 1991).

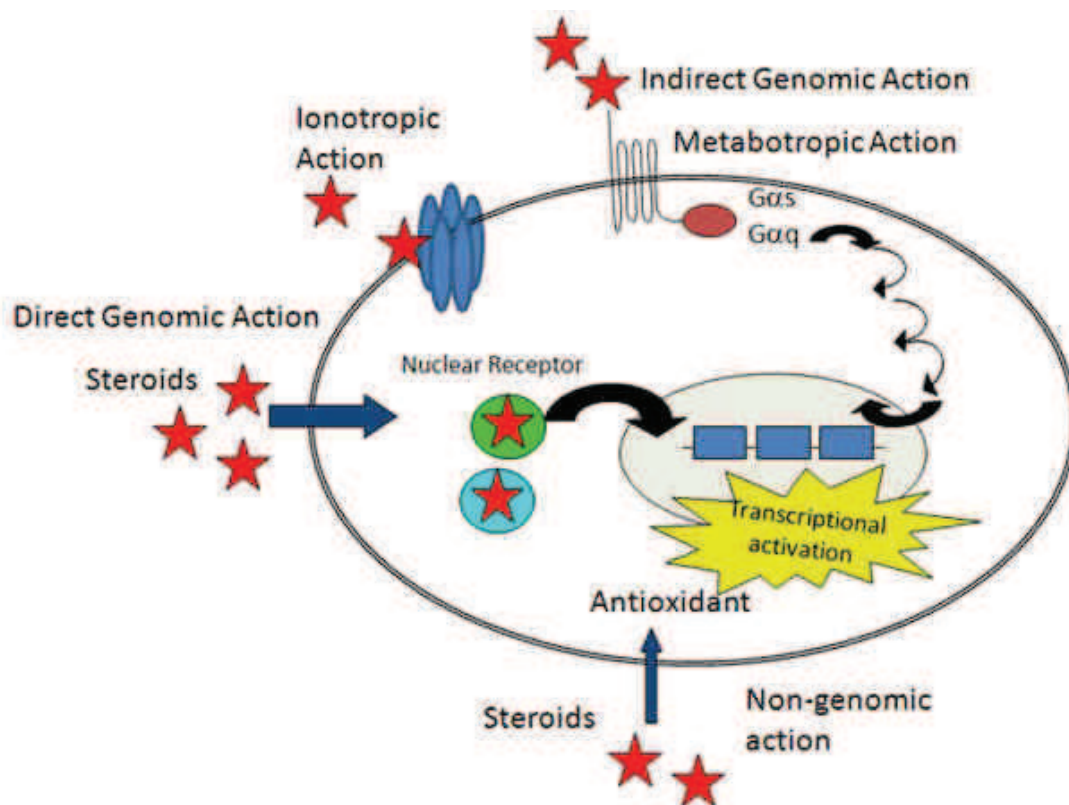


Figure 11. Différents mécanismes d'action des stéroïdes

Les hormones stéroïdiennes peuvent produire leurs effets par différents mécanismes d'action. Les hormones peuvent lier leurs récepteurs nucléaires, activer des récepteurs-canaux ou des récepteurs membranaires associés à des protéines G ou avoir un effet direct sous forme d'antioxydant (Figure originale, Coulombe MA, 2008).

2.1.2 Action génomique des stéroïdes gonadiques

Les hormones sexuelles ont un impact important sur l'ensemble du système nerveux central. En fait, plusieurs liens sont à faire avec l'étude de la douleur et les mécanismes de transmission et d'inhibition de la douleur. Il a tout d'abord été démontré que les récepteurs de ces hormones sexuelles sont localisés dans plusieurs régions impliquées dans la perception de la douleur. En effet, le

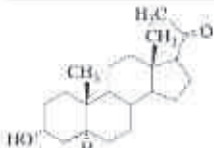
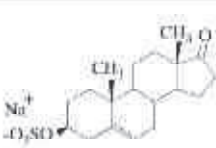
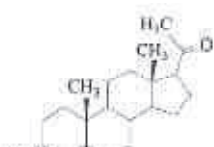
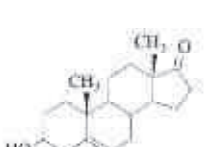
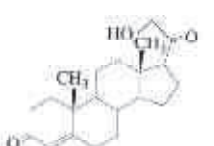
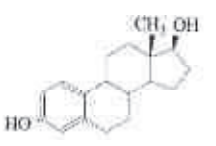
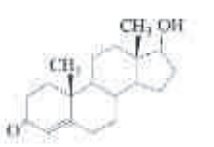
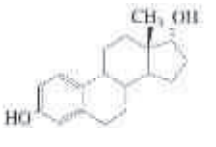
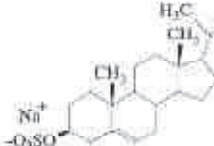
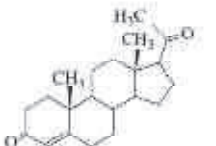
circuit comprenant la substance grise périaqueducatale, la médulla rostroventrale et la moelle épinière (SGPA-MRV-MÉ) est organisé et fonctionne différemment entre les mâles et les femelles (Lloyd et Murphy, 2006).

Il est important de considérer que 20 à 25% des neurones de la SGPA-MRV contiennent des récepteurs de l'estrogène de type α (ER α) et des androgènes (AR) (Murphy et Hoffman, 2001; Lloyd et Murphy, 2008). Le récepteur à l'estrogène, de même que le récepteur à l'androgène, puisqu'ils se lient à un récepteur nucléaire, ont la capacité de moduler la transcription de récepteurs, mais peuvent aussi influencer la synthèse de neurotransmetteurs (Murphy et Hoffman, 2001). Plusieurs types de neurones sont présents dans la SGPA, ce qui produit des effets parfois excitateurs et parfois inhibiteurs. Par exemple, il a été démontré que l'injection d'opioïdes dans la SGPA et la MRV permettait l'inhibition de neurones GABAergiques toniquement actifs, ce qui produit une désinhibition locale, et donc l'augmentation de l'excitabilité du circuit (Behbehani *et al.*, 1990; Chieng et Christie, 1994; Stiller *et al.*, 1995). De plus, l'expression différentielle des récepteurs AR, et possiblement d'ER β , pourrait expliquer la différence de sensibilité aux opioïdes entre les mâles et les femelles (Lloyd et Murphy, 2008).

2.1.3 Action des stéroïdes neuroactifs sur les récepteurs ionotropiques

L'effet anesthésique des stéroïdes a été observé par Cashin et Moravek en 1927 (Cashin et Moravek, 1927) et par la suite par Selye en 1941 (Selye, 1941a; Selye, 1941c; Selye, 1941b) lors de l'injection de cholestérol ou d'autres hormones naturelles chez des animaux. Il est intéressant de mentionner que, déjà en 1941, Selye observa une différence marquée des propriétés anesthésiques des stéroïdes entre les mâles et les femelles (Selye, 1941b). De nos jours, l'influence des stéroïdes 3α - 5α -réduits (allopregnanolone, AP ; tétrahydrodéoxycorticostéone, THDOC ; 3α -androstane- 3α -diol, α diol) est bien connue (Gee, 1988), de même que celle des dérivés sulfatés (prégnénone sulfate, PregS ; déhydroépiandrosterone sulfate, DHEAS). Ces stéroïdes peuvent moduler l'excitabilité neuronale, principalement *via* l'activation des récepteurs ionotropiques (Tableau 1) (Gee, 1988).

Summary of modulatory effects of NAS on different receptor systems

STEROID	RECEPTOR	TYPE OF MODULATION	STEROID	RECEPTOR	TYPE OF MODULATION
 Allopregnanolone 3 α Hydroxy-5α-pregnan-20-one 3 α,5α tetrahydroprogesterone	GABA _A 5-HT ₁	Positive Negative	 Dehydroepiandrosterone sodium sulphate (DHEAS)	GABA _A Sigma Type I	Negative Positive
 3 α Hydroxy-5β-pregnan-20-one 3 α,5 β tetrahydroprogesterone	GABA _A	Positive	 Dehydroepiandrosterone (DHEA)	NMDA	Positive
 11 Deoxycorticosterone (DOC)	GABA _A	Positive	 17 β-Estradiol	NMDA Kainate 5-HT ₁	Negative Positive Negative
 Testosterone	GABA _A 5-HT ₁	Positive Negative	 17 α-Estradiol	5-HT ₁	Negative
 Pregnenolone sulfate, sodium salt	GABA _A NMDA AMPA Kainate Glycine 5-HT ₁ Sigma Type I	Negative Positive Negative Negative Negative No effect Negative	 Progesterone	Kainate Glycine 5-HT ₁ Nicotinic Ach Oxytocin	Positive Negative Negative Negative Negative

Abbreviations:

AMPA: α- amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; DHEA: dehydroepiandrosterone; GABA_A: γ- aminobutyric acid;NMDA: N-methyl-D-aspartate; Nicotinic Ach: Nicotinic acetylcholine; 5-HT₁: serotonin

Tableau 1. Action des stéroïdes sur les différents récepteurs du système nerveux central.

Les différents stéroïdes neuroactifs peuvent avoir des effets positifs ou négatifs sur plusieurs récepteurs. Tableau tiré de (Dubrovsky, 2005). Droits de reproduction obtenus # 11076206.

Une des premières études ayant soulevé la possibilité de l'action des stéroïdes gonadiques dans la moelle épinière et qui suggérait un rôle de ces hormones dans la perception de la douleur a été effectuée par Sheridan et Weaker (1981). Ils ont observé que le 3H-dihydrotestostérone se liait dans des régions de la moelle épinière contrôlant les réflexes sexuels et la perception de la douleur. Même si la différence de perception de la douleur entre les hommes et les femmes a été observée lors d'études aussi vieilles que celle de 1933, ce n'est que dans les années 80 que le rôle des hormones gonadiques a été étudiée dans cette différence (Herren, 1933; Romero *et al.*, 1987; Romero *et al.*, 1988; Forman *et al.*, 1989).

La plupart des études s'intéressant aux actions membranaires des stéroïdes ont centralisé leurs efforts sur le récepteur GABA_A, puisque ce récepteur est très sensible aux stéroïdes, particulièrement aux métabolites 3 α -5 α -réduits (Gee, 1988; Belelli *et al.*, 2005). Le récepteur GABA_A est composé de cinq sous-unités (Figure 12A), généralement 2 α 2 β γ , mais plus de 19 compositions ont été décrites) (Barnard *et al.*, 1998; Minier et Sigel, 2004; Mohler *et al.*, 2004; Farrant et Nusser, 2005; Sieghart, 2006; Mohler, 2007). Ce récepteur est perméable aux ions chlorures et bicarbonates (McEwen, 1991; Belelli *et al.*, 2005), et dépendamment de la composition de ses sous-unités, possède des propriétés physiologiques et pharmacologiques différentes (Belelli *et al.*, 2005; Farrant et Nusser, 2005). Par exemple, s'il y a une sous-unité δ dans le récepteur GABA_A, ces récepteurs se retrouvent principalement au niveau extrasynaptique du neurone et possèdent une sensibilité très grande pour les stéroïdes 3 α -réduits, mais une insensibilité aux benzodiazépines (Saxena et Macdonald, 1994; Nusser *et al.*, 1998; Haas et Macdonald, 1999; Mihalek *et al.*, 1999; Adkins *et al.*, 2001; Brickley *et al.*, 2001; Belelli *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2002; Stell et Mody, 2002; Wohlfarth *et al.*, 2002; Stell *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2003; Semyanov *et al.*, 2004; Farrant et Nusser, 2005; Mody, 2005; Mitchell *et al.*, 2008). Au contraire, les récepteurs GABA_A qui possèdent une sous-unité ϵ , ou une hyperphosphorylation par la protéine kinase C (PKC), sont insensibles aux stéroïdes 3 α -réduits (Davies *et al.*, 1997; Hodge *et al.*, 1999; Hodge *et al.*, 2002; Brussaard et Koksma, 2003; Koksma *et al.*, 2003; Song et Messing, 2005; Vergnano *et al.*, 2007).

Les récepteurs GABA_A peuvent être situés au niveau synaptique ou au niveau extrasynaptique (Farrant et Nusser, 2005). La libération du GABA vésiculaire produira une inhibition de l'excitabilité neuronale par la liaison aux récepteurs GABA_A postsynaptiques. Cependant, lors de la liaison de GABA à un récepteur extrasynaptique cette inhibition neuronale dure plus longtemps (inhibition tonique). Ce type d'inhibition est observé particulièrement lors de l'activation des récepteurs GABA_A contenant une sous-unité δ (Stell *et al.*, 2003).

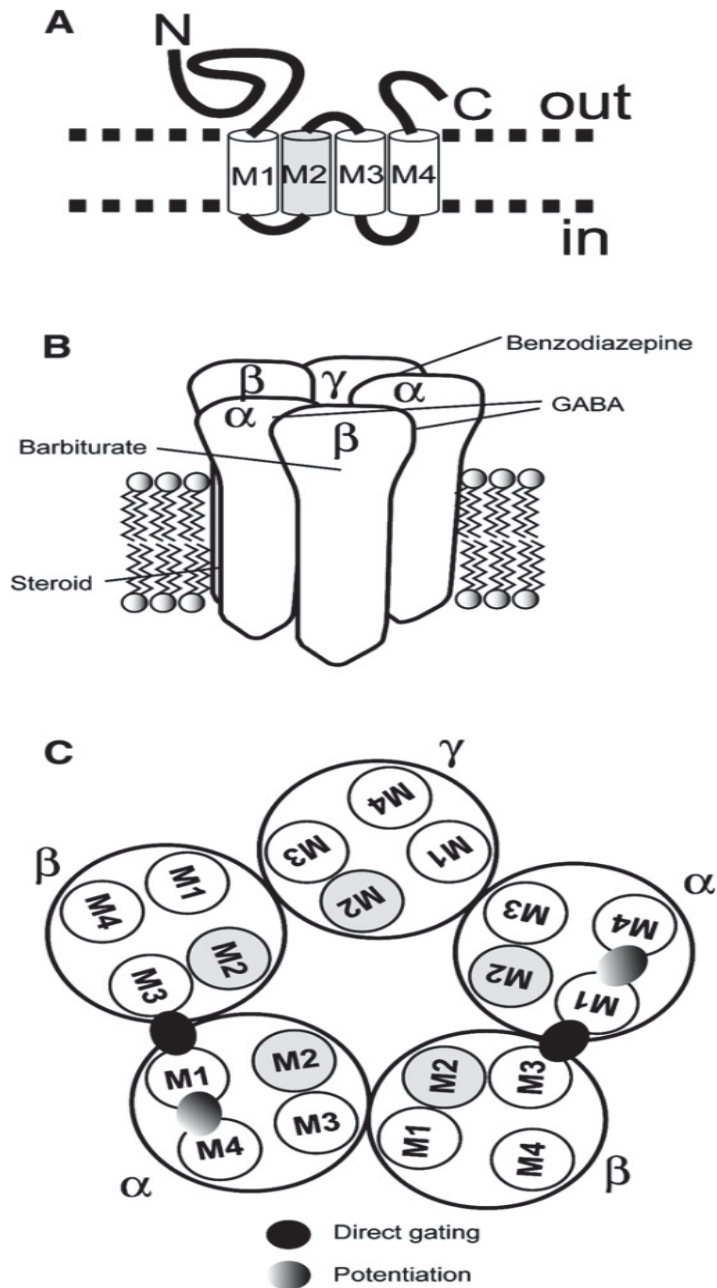


Figure 12. Le récepteur GABA_A, ses domaines transmembranaires et la liaison des neurostéroïdes

A) Schéma représentant une sous-unité du récepteur GABA_A et ses quatre domaines transmembranaires. B) Structure pentamérique de type 2α2βγ du récepteur GABA_A et ses sites de liaison pour les différentes drogues modulant son activité. C) Sites de modulation du récepteur par les neurostéroïdes. Il existe des sites de potentialisation et des sites d'activation directe du récepteur ayant des affinités différentes. Image tirée de (Akk *et al.*, 2007). Droits de reproduction obtenus # 11076211.

Le récepteur GABA_A possède des sites spécifiques de liaison des neurostéroïdes (Figure 12B). Ils sont distincts des sites de liaison des barbituriques ou des benzodiazépines (Callachan *et al.*, 1987; Harrison *et al.*, 1987; Gee, 1988; Peters *et al.*, 1988; Shu *et al.*, 2004; Hosie *et al.*, 2006). Certaines études ont démontré qu'il existait au moins deux sites de liaison pour les neurostéroïdes sur le récepteur GABA_A (Figure 12C) (Belelli *et al.*, 2005; Hosie *et al.*, 2006). Akk et ses collaborateurs (2005), par une technique d'électrophysiologie, ont pu définir que les neurostéroïdes ne se lient pas à un site de liaison extracellulaire. En fait, les stéroïdes s'accumulent dans la membrane plasmique afin de rejoindre un site de liaison du récepteur par diffusion latérale ou par des voies intracellulaires (Akk *et al.*, 2005). Par la suite, Hosie et ses collaborateurs (2006) ont démontré que la liaison des stéroïdes 3 α -réduits ne se fait pas au niveau extracellulaire, mais bien entre les segments transmembranaires M1 et M4 des sous-unités α (Hosie *et al.*, 2006). Ce site de liaison a une très grande affinité pour les neurostéroïdes ce qui permet l'activation à de très faibles concentrations, de l'ordre du nanomolaire (Zhu et Vicini, 1997; Hosie *et al.*, 2006). De plus, les neurostéroïdes peuvent lier un site agoniste, localisé entre les sous-unités α et β , dans une cavité hydrophobique (Hosie *et al.*, 2006). Ce site agoniste permet la liaison de neurostéroïdes présents en concentration plus élevée, ou lorsque les autres sites de modulation sont déjà occupés (Majewska *et al.*, 1986; Callachan *et al.*, 1987; Akk *et al.*, 2005; Hosie *et al.*, 2006).

Les neurostéroïdes modulent la fréquence et la probabilité d'ouverture du canal GABA_A (Callachan *et al.*, 1987; Mellon *et al.*, 2001), ce qui permet d'augmenter ou de diminuer l'entrée d'ions dans les neurones. Ces composés peuvent agir comme des modulateurs allostériques positifs ou négatifs à de très faibles concentrations (Mellon *et al.*, 2001). Les neurostéroïdes 3 α 5 α -réduits sont souvent des modulateurs positifs, tandis que les stéroïdes sulfatés sont des antagonistes non compétitifs (Majewska et Schwartz, 1987; Majewska *et al.*, 1988; Park-Chung *et al.*, 1999; Gulinello *et al.*, 2001; Gulinello *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002).

Le récepteur NMDA peut être modulé positivement (PregS et DHEA) ou négativement (Prégnanolone) par les neurostéroïdes à concentration nanomolaire (Park-Chung *et al.*, 1994; Rupprecht, 1997; Mellon et Griffin, 2002; Johansson *et al.*, 2008). Tout comme pour le récepteur GABA_A, le récepteur NMDA possède deux sites de liaison aux neurostéroïdes (Horak *et al.*, 2006). Souvent, lors de la liaison d'un stéroïde, le mécanisme d'action du récepteur NMDA implique l'activation du récepteur sigma 1 (Chen *et al.*, 2006).

Le récepteur sigma 1 est un autre récepteur capable de lier les neurostéroïdes comme la progestérone (antagoniste), la PregS (agoniste inverse) et la DHEAS (agoniste) (Su *et al.*, 1988; Bouchard *et al.*, 1993; Monnet *et al.*, 1995; Bouchard *et al.*, 1997; Baulieu, 1998). Le rôle et le mécanisme d'action du récepteur sigma 1 n'est pas encore bien compris. Cependant, il semblerait que l'activation du récepteur sigma 1 permette la phosphorylation du récepteur NMDA dans la moelle épinière, et donc modulerait sa réponse (Monnet *et al.*, 1990; Monnet *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008; Roh *et al.*, 2008). Ce est exprimé dans le système nerveux central, particulièrement dans l'hippocampe et le système limbique (Walker *et al.*, 1990; Maurice *et al.*, 1994; Debonnel *et al.*, 1996; Palacios *et al.*, 2003; Phan *et al.*, 2003; Alonso *et al.*, 2004; Hayashi et Su, 2004a; Hayashi et Su, 2004b; Palacios *et al.*, 2004). Lorsqu'il est activé, le récepteur sigma 1 produit une augmentation de l'influx calcique. Cela est produit par l'activation d'une cascade intracellulaire associée à une protéine G (Hayashi *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2008). Des essais de liaisons ont démontré que le récepteur sigma 1 lie les neurostéroïdes à des concentrations de l'ordre du nanomolaire pour la progestérone, et de l'ordre du micromolaire pour la testostérone, le THDOC, et la PregS (Maurice *et al.*, 1996). Ces concentrations se retrouvent physiologiquement lors de stress ou en période de gestation (Su *et al.*, 1988; Walker *et al.*, 1990; Monnet et Maurice, 2006). Plusieurs études ont suggéré un rôle du récepteur sigma 1 dans la modulation du récepteur NMDA, mais aussi dans la modulation du récepteur GABA_A et de la conductance potassique (Soriani *et al.*, 1998; Soriani *et al.*, 1999; Maurice *et al.*, 2006). Puisque le récepteur sigma 1 est impliqué dans l'analgésie opioïdergique associée

aux récepteurs opioïdes μ , δ , et κ supraspinaux, il a été suggéré que le récepteur sigma 1 pouvait aussi être impliqué dans la nociception (Mei et Pasternak, 2002). En effet, il a été observé que l'activation du récepteur sigma 1 diminuait l'analgésie produite par les récepteurs des peptides opioïdes (Mei et Pasternak, 2002). De plus, plusieurs neurostéroïdes semblent être des agonistes ou des antagonistes du récepteur sigma 1, particulièrement la DHEA, et seraient impliqués dans la modulation de la nociception de cette manière (Maurice, 2001; Maurice *et al.*, 2006; Kibaly *et al.*, 2008; Maurice et Su, 2009).

Enfin, l'application exogène de neurostéroïdes peut aussi moduler l'excitabilité neuronale par la modulation de canaux ioniques voltage-dépendants (Gee, 1988). Il s'agit en effet du cas des canaux calciques, mais aussi des canaux potassiques (Nabekura *et al.*, 1986; Blackmore *et al.*, 1990; French-Mullen *et al.*, 1994; French-Mullen, 1999). Les neurostéroïdes inhibent ces canaux ioniques à très faibles concentrations (nanomolaire/picomolaire). Ils agissent directement ou indirectement par l'intermédiaire de cascades de transduction intracellulaires associées aux protéines G. Les effets des neurostéroïdes sur la modulation de l'excitabilité neuronale peuvent s'effectuer à l'intérieur d'une minute, ce qui suggère un effet rapide non génomique (Nabekura *et al.*, 1986; Pathirathna *et al.*, 2005a). Les canaux calciques voltage-dépendant sont des éléments très importants dans le processus de la douleur, en particulier dans la création des messages nociceptifs par les neurones sensoriels périphériques (Julius et Basbaum, 2001; Zamponi *et al.*, 2009).

2.2 Différence de perception de la douleur entre les mâles et les femelles

2.2.1 Différence de la réponse nociceptive chez les mâles et les femelles

Plusieurs études ont démontré que la douleur est perçue différemment entre les hommes et les femmes (Fillingim et Gear, 2004; Racine *et al.*, 2012b, 2012a). En plus de la perception de la douleur, l'analgésie provoquée par certains

agents pharmacologiques serait aussi différente (Mogil *et al.*, 2003). Plusieurs travaux chez l'animal ont tenté de faire la lumière sur ces différences de perception de la douleur. Au laboratoire, les travaux de Gaumont et ses collaborateurs (2002), réalisés chez le rat, ont notamment permis de mettre en évidence l'implication des hormones sexuelles dans la modulation de la douleur lors du test à la formaline (Gaumont *et al.*, 2002, 2005) (Figure 13).

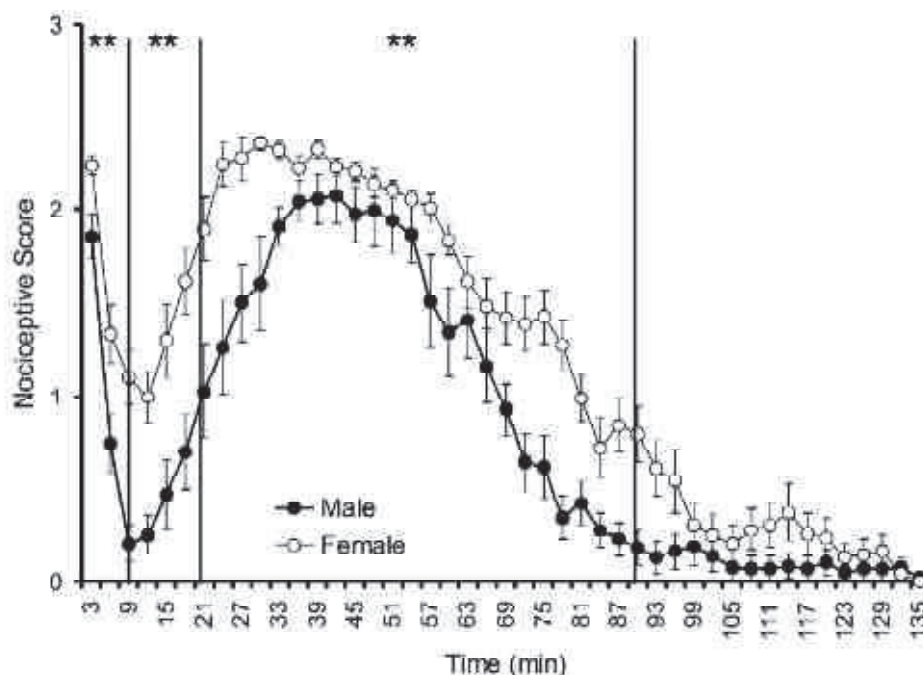


Figure 13. Différence de la réponse nociceptive des mâles et des femelles au test à la formaline

Le test à la formaline est utilisé pour sa réponse comportementale typique triphasique, exprimée ici en score nociceptif en fonction du temps. La première phase (0-6 minutes) est une phase de douleur aiguë qui est associée à l'activation des fibres afférentes nociceptives. La seconde phase (21- 90 minutes) représente une douleur tonique de type inflammatoire. L'interphase (9-21 minutes) implique des mécanismes actifs d'inhibition de la douleur. Ce graphique représente la réponse nociceptive au test à la formaline chez les rats mâles et femelles. Image tirée de (Gaumond *et al.*, 2002). Droits de reproduction obtenus #11071744.

Cependant, une très grande controverse est présente dans la littérature concernant ces différences de réponses à la douleur. Plusieurs études présentent des résultats contradictoires ou incertains. Leo et ses collaborateurs (2008) ont bien relaté cette variabilité lorsqu'ils ont tenté de mettre en relation les souches de souris, le sexe et les différents types de douleur (Tableau 2).

Type de douleur	Test comportemental	Différence entre les souches, p	Différence entre les sexes, p
-----------------	---------------------	-----------------------------------	---------------------------------

Aiguë	Plaque chaude fixe	$p < 0.0001$	NS
	Test du retrait de la queue	$p < 0.0001$	$p = 0.0011$
	Test de Hargreave	$p < 0.0001$	$p = 0.0015$
	Test du filament de Von Frey	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$
	Rotarode	$p = 0.0056$	NS
Inflammatoire	Inflammation à la carragénine	$p < 0.0001$	$p = 0.0006$
	Test à la formaline	$p < 0.0001$	NS
	Douleur viscérale à l'acide acétique	$p < 0.0001$	NS
Neuropathique lésionnelle	Test de Von Frey	$p = 0.0001$	$p = 0.0106$
	Test de l'acétone	NS	NS
	Incapacitance	NS	NS

Tableau 2. Relation entre les souches de souris, le sexe et la réponse nociceptive à différents tests comportementaux

La réponse nociceptive, dépendamment du type de douleur et du test comportemental utilisé, peut varier en fonction de la souche et du sexe. NS : Non significatif. Adaptation de (Leo *et al.*, 2008)

La complexité de l'étude des différences entre les mâles et les femelles est aussi bien représentée par la revue de littérature publiée par Kuba et Quinones-Jenab (2005). On peut voir que la direction des différences entre les mâles et les femelles peut varier dépendamment du modèle de douleur utilisé (Tableau 3).

Test comportemental	Comparaison des douleurs entre les mâles et les femelles
Test à la formaline	F > M
Test de capsaïcine	F > M
Adjuvant de Freund	F > M
Test Carragénine	M > F
Constriction chronique du nerf sciatique	M > F

Tableau 3. Comparaison des réponses nociceptives des mâles et des femelles dans différents modèles de douleur

Selon le test comportemental utilisé, les femelles peuvent avoir une réponse nociceptive supérieure (F > M) ou inférieure (M > F) aux mâles. M : Mâles; F : Femelles. Adaptation de (Kuba et Quinones-Jenab, 2005).

2.2.2 Implication des hormones gonadiques dans la réponse nociceptive chez l'animal

En ce qui concerne le rôle des hormones gonadiques, les tendances sont aussi très variables. Il est possible d'observer un effet dans une direction ou une autre, ou bien pas d'effet du tout (Kuba et Quinones-Jenab, 2005) (Tableau 4).

Test comportemental	Comparaison des douleurs
Test à la formaline	CAST > Intact
Test à la formaline	OVX > Intact
Test à la carragénine	OVX < Intact
Test à la capsaïcine	CAST > Intact

Tableau 4. Implication des hormones gonadiques dans la réponse nociceptive

Dépendamment du test comportemental utilisé, la gonadectomie des animaux peut avoir des effets différents sur la réponse nociceptive. OVX : Ovariectomisés ; CAST : castrés. Adaptation de (Kuba et Quinones-Jenab, 2005).

Ces tableaux sont bien sûr non exhaustifs et ne rapportent que quelques cas, avec des conditions expérimentales précises. L'étude de tous les projets de recherche relatant des différences de perception de la douleur entre les mâles et les

femelles gonadectomisés ou non serait bien plus longue et complexe, mais la conclusion finale serait la même.

2.2.3 Implication des hormones gonadiques dans les MCDD

Globalement, il existe des différences de réponse nociceptive entre les mâles et les femelles, mais il existe aussi des différences de modulation de la douleur. Romero et Bodnar (1986) ont été l'un des premiers groupes à s'intéresser aux différences d'analgésie associée à différents types d'AIS entre les mâles et les femelles. Ils ont démontré que l'amplitude de l'analgésie des femelles (opioïdérique et non opioïdérique) était plus faible que celle des mâles. Un point intéressant de leur étude est qu'ils ont démontré que l'hypothermie induite par les nages forcées n'est pas responsable de l'AIS (Romero *et al.*, 1987).

Par la suite, Mogil et ses collaborateurs (1993) se sont intéressés au rôle activationnel des hormones sexuelles lors d'AIS. Ils ont étudié différents paradigmes de nage forcée, tous d'une durée de 3 minutes, mais à des températures différentes soit : 15°C (non opioïdérique), 20°C (mixte), 32°C (opioïdérique). Ils ont pu observer que chez les femelles, les AIS non opioïdériques et mixtes sont insensibles au MK-801, un antagoniste des récepteurs NMDA. Ces résultats suggéraient une différence neurochimique dans les MCDD. L'ovariectomie et le remplacement hormonal ont permis de définir que cette insensibilité aux antagonistes NMDA était dépendante de la présence d'estrogène chez la femelle. En effet, lorsque les femelles étaient ovariectomisées, celles-ci étaient sensibles aux antagonistes NMDA. Par contre, lorsque de l'estrogène leur était administré pendant six jours, leur insensibilité aux antagonistes NMDA était rétablie. Étonnamment, ce mécanisme activationnel chez la femelle ne semblait pas l'être chez le mâle. En effet, la sensibilité aux antagonistes NMDA demeurait malgré une castration, et même lors de castration et de remplacement hormonal d'estrogène (Mogil *et al.*, 1993). Ces résultats suggèrent des mécanismes d'analgésie endogène différents entre les mâles et les femelles, ce qui permet de suggérer aussi un possible effet organisationnel. En effet, les résultats obtenus en 1995, par Mogil, démontrent que les femelles ayant

reçu de la testostérone au jour postnatal 1 avaient un comportement d'AIS équivalent à celui d'un mâle, c'est-à-dire que leur AIS non opioïdérique était partiellement (et non complètement comme les mâles) sensible aux antagonistes NMDA. Aucun résultat n'est disponible chez le mâle puisque tous les animaux manipulés au jour postnatal 1 (castré et non castré) ont développé une insensibilité aux antagonistes NMDA. Ceci permettrait de suggérer que les mécanismes neurochimiques de l'AIS non opioïdérique pourraient aussi être régulés par le stress périnatal (Sternberg *et al.*, 1995). Tant chez l'humain que chez l'animal, une variation des réponses nociceptives a été observée au cours du cycle ovarien, certains exemples sont donnés dans ce tableau résumé par Kuba et Quinones-Jenab (2005) (Tableau 5).

Type de douleur	Effet observé
Études cliniques	
Migraine	↑ phase lutéale
Douleurs musculosquelettiques	↑ phase lutéale et folliculaire
Douleur temporomandibulaire	↑ phase lutéale
Lombalgie	↑ phase lutéale et menstruelle
Études précliniques	
Test à la formaline	Pas d'effet
Adjuvant de Freund	Pas d'effet ou ↑ en proestrus
Test à la carragénine	↓ en proestrus
Calculc urétrales	↓ en proestrus

Tableau 5. Variation des conditions douloureuses au cours du cycle ovarien chez les animaux et les humains

La réponse à la douleur varie en fonction du cycle ovarien. Cette variation est observée autant chez l'animal que chez l'humain. ↑: augmentation des douleurs; ↓: diminution des douleurs. Adaptation de (Kuba et Quinones-Jenab, 2005).

2.2.4 Variation de la réponse nociceptive lors du cycle ovarien

Le cycle ovarien des rongeurs est assez similaire à celui de la femme, à la différence que le cycle du rongeur est d'une durée plus courte (4 jours vs 28 jours), ce qui le rend plus difficile à observer. Le cycle menstruel de la femme débute par la phase menstruelle suivie de la phase folliculaire. Ces deux phases sont caractérisées par des niveaux d'hormones gonadiques relativement faibles. Lors de l'augmentation de LH et d'estradiol, il y a libération de l'ovule qu'on appelle la phase ovulatoire. Finalement, pendant la phase lutéale, il y a augmentation de la progestérone et maintien de l'estradiol en début de phase, suivie d'une chute de ces deux hormones permettant le retour à la phase menstruelle. Le cycle ovarien du rat débute par une phase assez similaire à la phase folliculaire chez l'humain, durant laquelle les niveaux d'hormones gonadiques sont faibles. La phase que l'on nomme *diestrus* est représentative de la phase lutéale, que l'on peut séparer en *diestrus* précoce, où l'on observe une

augmentation de l'estradiol et de la progestérone, et le diestrus tardif, où il y a chute des hormones gonadiques. Finalement, le proestrus représente la phase ovulatoire. Pendant cette phase, tout comme chez l'humain, il y a augmentation de la LH et de l'estradiol, cependant il y a aussi augmentation de la progestérone.

Un des premiers chercheurs à étudier le rôle du cycle menstruel sur la perception de la douleur expérimentale chez l'humain a été Herren en 1933. Ce chercheur a suivi cinq femmes pendant 11 cycles menstruels complets. Il a mesuré le seuil nociceptif mécanique, à l'aide d'une pression appliquée sur l'avant-bras, pendant la phase prémenstruelle, la phase folliculaire et la phase ovulatoire de ces femmes. Il a pu observer que le seuil nociceptif était diminué lors de la phase prémenstruelle (Herren, 1933). Ces résultats ont été reproduits par Proccaci et ses collaborateurs en 1974. Cependant, les résultats deviennent plus controversés à partir de 1980 où les résultats sont moins explicites (Riley *et al.*, 1999). De façon générale, les résultats montrent un seuil de douleur plus élevé durant la phase folliculaire ou une plus grande sensibilité pendant la phase prémenstruelle ou menstruelle (Riley *et al.*, 1999). Au laboratoire, lors de l'évaluation des seuils de douleurs à l'aide d'une thermode à travers le cycle menstruel chez la femme, aucune différence n'a été observée. Cependant, l'augmentation des CIDN a été notée lors de la phase ovulatoire (Tousignant-Laflamme et Marchand, 2009); ces résultats seront discutés plus loin.

2.2.5 Modulation de la réponse nociceptive par les MCDD lors du cycle ovarien

Ryan et Maier (1988) se sont intéressés au rôle du cycle ovarien par rapport à l'amplitude de l'AIS. Leur étude a démontré une variabilité de l'AIS opioïdérique et non opioïdérique à travers le cycle ovarien. Ils ont observé une AIS supérieure durant le diestrus en comparaison de l'estrus (Ryan et Maier, 1988). Par la suite, à l'aide de remplacement estrogénique, ils ont pu démontrer que l'estradiol affectait particulièrement l'AIS opioïdérique. En effet, la gonadectomie des rats produisait une inhibition de l'AIS opioïdérique alors que le remplacement estrogénique le rétablissait. Un point intéressant de ce résultat est l'effet antithétique de l'estrogène, tout comme l'effet de plusieurs autres stéroïdes.

En l'absence d'estradiol, une diminution de l'AIS est observée par rapport à la phase diestrus ou au remplacement en estradiol à dose moyenne. Cependant, à forte dose, ou à dose répétée, l'AIS est de nouveau diminuée.

Comme mentionné plus tôt, Tousignant-Laflamme et Marchand (2009) suggèrent une modulation des CIDN pendant le cycle menstruel chez les sujets sains. Ceux-ci proposent qu'il y ait amplification de l'efficacité du CIDN lors de l'ovulation chez la femme (augmentation importante de la concentration plasmatique d'estradiol et de la LH). Cette inhibition active serait beaucoup plus importante à ce moment en comparaison aux autres phases du cycle menstruel. D'autres études ont une perspective différente suggérant que le cycle menstruel modifierait les contrôles facilitateurs descendants (Devall et Lovick, 2010) et que ce serait plutôt les phases lutéale et menstruelle où l'analgésie seraient diminuées.

Dans le même ordre d'idées, l'équipe de Lovick suggère que le retrait de la progestérone à la fin de la phase lutéale produirait une augmentation de l'expression des récepteurs GABA_A dans la SGPA. Ces récepteurs seraient de type $\alpha_4\beta_1\delta$, une composition du récepteur GABA_A extra-synaptique qui induirait une inhibition tonique ; à l'opposé d'une composition incluant la sous-unité γ_2 qui serait davantage synaptique et qui favoriserait une inhibition plutôt phasique. L'augmentation de l'expression du récepteur GABA_A se produirait particulièrement sur les neurones GABAergiques de projection de l'amygdale vers la SGPA. L'activité associée à ces récepteurs GABA_A contenant des sous-unités $\alpha_4\beta_1\delta$ serait une désinhibition des neurones de projection produisant une augmentation de l'excitabilité du circuit et augmenterait la douleur. Ce groupe associe la nociception à l'anxiété et mentionne que l'augmentation de l'anxiété se reflète par l'augmentation de la sensibilité à la douleur. Cependant, quand l'anxiété devient plutôt un stress intense, celui-ci induit l'inhibition de la douleur par un mécanisme d'analgésie induite par le stress.

Il a été observé lors de la phase lutéale que les femmes sont souvent plus irritables et présentent plus d'anxiété et de dépression que les hommes. Il n'est pas

étonnant de constater que c'est aussi durant cette période que les seuils de douleurs sont les plus bas et que la présence de douleurs est la plus élevée. Une pathologie représentant bien ces faits est le trouble de dysphorie prémenstruelle. Les femmes atteintes par cette pathologie présentent de l'irritabilité, une dépression et une instabilité de l'humeur lors de la phase lutéale. Un fait intéressant est que ces femmes rapporteraient plus de douleur que les femmes saines au même stade du cycle menstruel (Amital *et al.*, 2010).

La phase lutéale est un moment de grande variation hormonale. Cependant, il n'y a pas que les hormones gonadiques typiques qui sont modulées, leurs métabolites $3\alpha,5\alpha$ -réduits le sont aussi. L'étude de cerveaux post-mortem a permis de décrire que les variations de concentrations plasmatiques de progestérone, de 5α -dihydroprogestérone et d'allopregnanolone plasmatiques se répercutent dans le cerveau. Il a d'ailleurs été démontré que les concentrations de ces stéroïdes dans le cerveau étaient supérieures lors de la phase lutéale du cycle menstruel (Bixo *et al.*, 1997) (Figure 14).

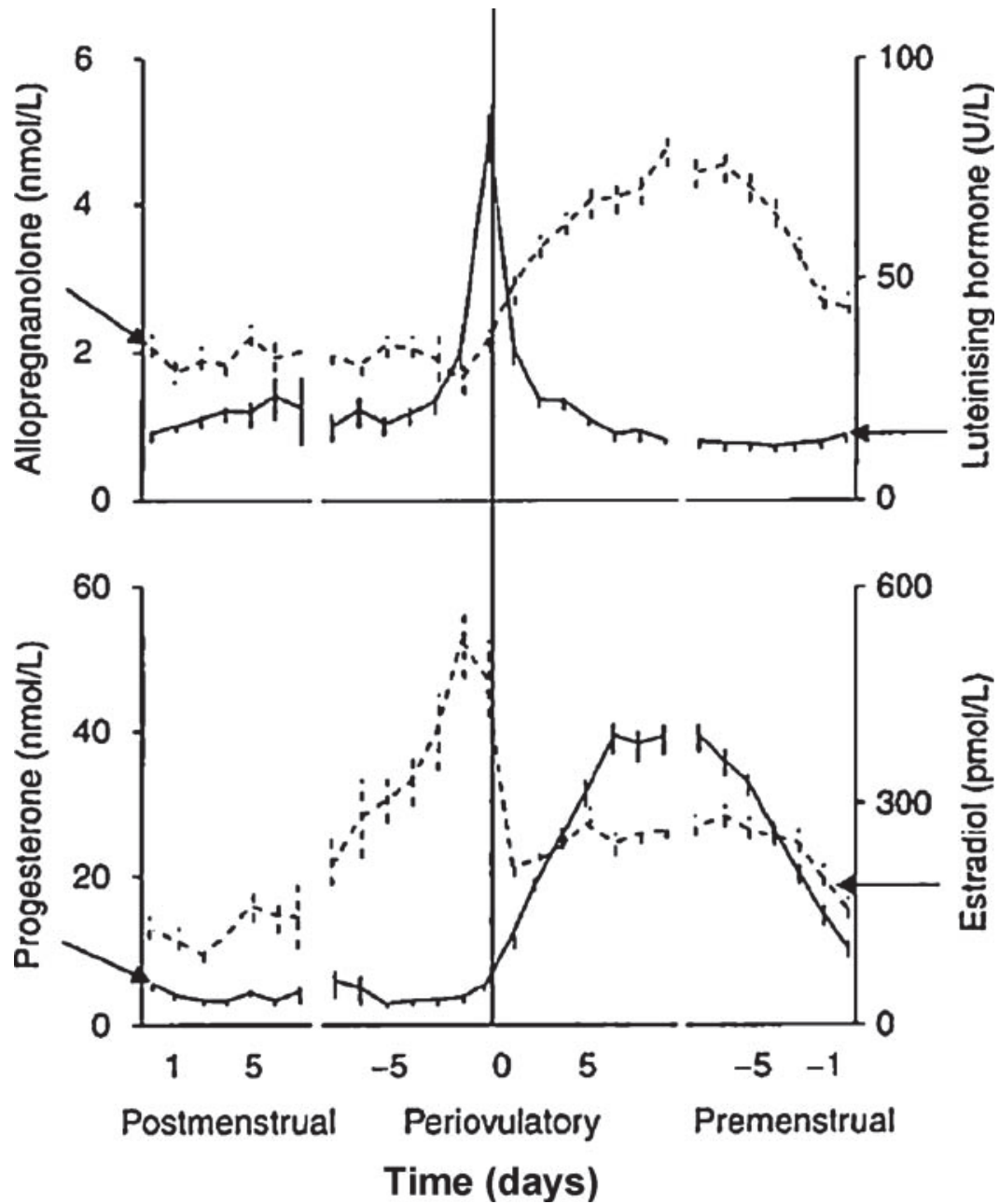


Figure 14. Concentration de progestérone, d'estradiol, de LH et d'allopregnanolone à travers le cycle menstruel.

Ce schéma représente les variations hormonales au cours du cycle menstruel chez l'humain. On peut observer l'augmentation parallèle de la progestérone et de l'allopregnanolone plasmatique lors de la phase lutéale du cycle. Image tirée de (Andreen *et al.*, 2009). Droits de reproduction obtenus #11071751.

2.2.6 Implication des métabolites 3 α 5 α -réduits dans la modulation de la réponse nociceptive lors du cycle ovarien

Le rôle des neurostéroïdes (dont la notion sera développée un peu plus loin) a été observé dans plusieurs psychopathologies et pourrait très bien contribuer aux symptômes de l'humeur lors du cycle menstruel. Du moins, il a été démontré que les symptômes de l'humeur ne sont pas associés à l'activation des récepteurs nucléaires de la progestérone, ce qui supporte le rôle des stéroïdes par un mécanisme d'action associé à l'activation de récepteurs membranaires tels que les récepteurs GABA_A. Cependant, ces allégations ne font pas consensus dans la communauté scientifique. En effet, un effet biphasique de l'allopregnanolone sur l'humeur a été observé. À faible concentration l'allopregnanolone provoque des effets dits «positifs» sur l'humeur (augmentation des comportements par rapport à un sujet sain), tels que l'irritabilité, l'agressivité et l'anxiété. Par contre, à concentration plus élevée, ce sont les effets dits négatifs (déclin des fonctions comportementales par rapport à un sujet sain), tels que l'anesthésie, les effets anxiolytiques et anticonvulsivants qui sont observés (Figure 15).

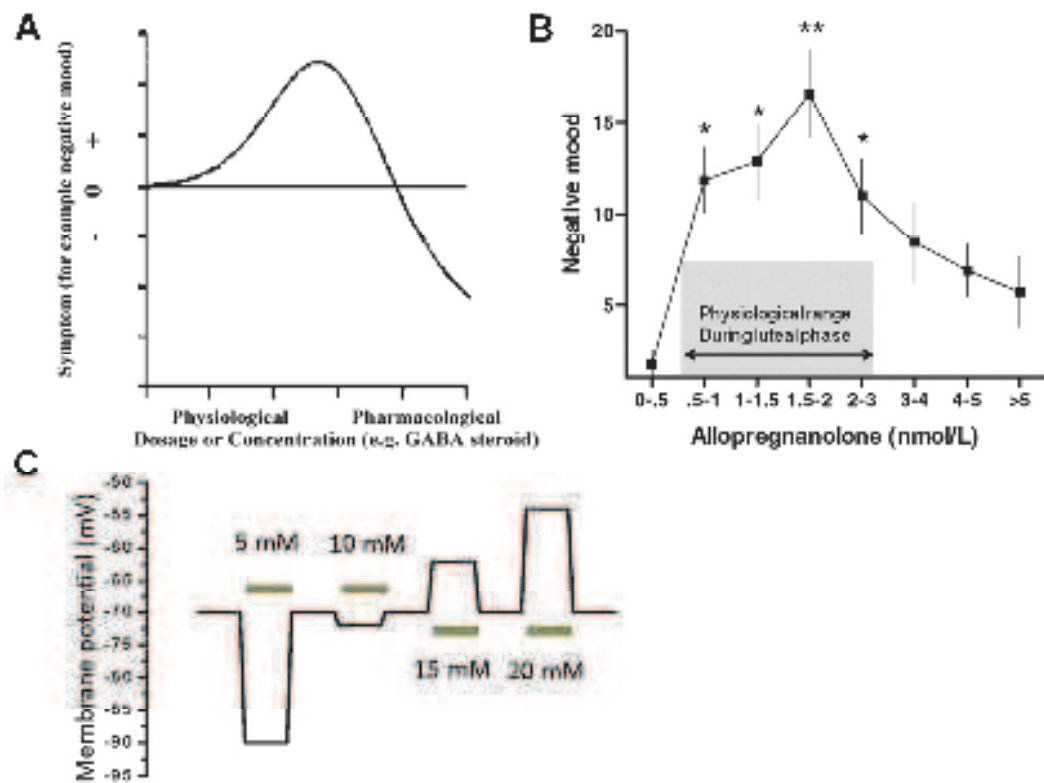


Figure 15. Effet biphasique des neurostéroïdes.

A) Modèle hypothétique de l'action biphasique médié par les agonistes du récepteur GABA_A chez certains individus. À faible concentration l'allop régnanolone provoquerait des effets dits positifs (augmentation des comportements par rapport à un sujet sain) sur l'humeur tels que l'irritabilité, l'agressivité et l'anxiété. Par contre, à concentration plus élevée ce sont les effets négatifs (déclin des fonctions comportementales par rapport à un sujet sain) tels que l'anesthésie, les effets anxiolytiques et anticonvulsivants qui sont observés. Image tirée de (Andreen *et al.*, 2009). Droits de reproduction obtenus #11071751.

B) Ces effets sont mesurés de façon plus concrets lors de l'évaluation des symptômes négatifs en relation avec les concentrations plasmatiques d'allop régnanolone chez des femmes pendant la phase lutéale de leur cycle menstruelle (concentrations marquées d'un rectangle gris) et chez des femmes postménopausée. Image tirée de (Bäckström *et al.*, 2011). Droits de reproduction obtenus #11105789.

C) Cet effet biphasique se reflète aussi sur le potentiel de membrane. En effet, celui-ci est modifié par l'activation du récepteur GABA_A à des concentrations intracellulaires de Cl⁻ de 5, 10, 15, et 20 mM. Image tirée de (Bäckström *et al.*, 2011). Droits de reproduction obtenus #11105789.

Il a été observé que de faibles concentrations de neurostéroïdes activaient particulièrement les récepteurs GABA_A impliqués dans l'inhibition tonique, tandis que de fortes concentrations de neurostéroïdes activaient davantage les récepteurs GABA_A impliqués dans l'inhibition phasique (Farrant et Nusser, 2005; Herd *et al.*, 2007). En effet, les récepteurs GABA_A contenant la sous-unité δ sont impliqués dans l'inhibition tonique et possèdent un très faible EC₅₀ (EC₅₀ : concentration nécessaire pour produire 50% de l'effet maximal) en comparaison aux récepteurs d'autres compositions (Belelli *et al.*, 2009). Étonnamment, seuls les récepteurs chargés de l'inhibition tonique varient au cours du cycle ovarien, mais pas ceux chargés de l'inhibition phasique (Maguire *et al.*, 2005; Maguire et Mody, 2007, 2009). En effet, un des points intéressants est l'augmentation de l'expression des sous-unités $\alpha 4$ et δ lors de la phase lutéale (Griffiths et Lovick, 2005a; Griffiths et Lovick, 2005b; Smith *et al.*, 2007). Cette variation est possiblement une des causes qui expliquerait l'altération de la capacité de liaison des neurostéroïdes et des benzodiazépines au cours le cycle. Cette altération est aussi présente chez les sujets atteints du trouble de dysphorie prémenstruelle chez qui il y a une modification de la sensibilité des récepteurs GABA_A (Maguire *et al.*, 2009). En effet, il semblerait que chez cette population, les récepteurs GABA_A soient moins sensibles aux neurostéroïdes et aux benzodiazépines (Andreen *et al.*, 2009). Cependant, lors de traitement avec des inhibiteurs de la recapture de la sérotonine, la sensibilité des récepteurs GABA_A serait retrouvée (Andreen *et al.*, 2009).

2.3 L'action des stéroïdes et des neurostéroïdes dans la modulation de la douleur

2.3.1 La progestérone et ses métabolites 3 α 5 α -réduits

La progestérone est un stéroïde gonadique qui lie des récepteurs nucléaires, PR-A et PR-B. Cependant, ces métabolites 3 α 5 α -réduits peuvent lier le récepteur GABA_A ce qui leur donnent des propriétés neuroactives (Giangrande et McDonnell, 1999). L'expression des récepteurs de la progestérone (PR), notamment dans le noyau du raphé dorsal, est régulée, en partie, par l'estrogène

(Bethea, 1994; Alves *et al.*, 1998b). En effet, ce dernier augmente l'expression des PR, par contre, la progestérone produit un rétrocontrôle sur l'action de l'estradiol. L'existence de cette signalisation croisée entre les récepteurs de l'estrogène et de la progestérone a souvent été démontrée. Lors de l'activation des PR, il y a répression de l'expression des récepteurs de l'estrogène, ce qui module son activité dans le système nerveux central (Kraus *et al.*, 1995). Ces différentes observations ont aussi été rapportées lors d'études comportementales (Kuba *et al.*, 2006).

L'effet antinociceptif de la progestérone, de même que celui de ses métabolites $3\alpha,5\alpha$ -réduits, a été observé lors de plusieurs études (Kavaliers et Wiebe, 1987; Winfree *et al.*, 1992; Caba *et al.*, 1994; Frye et Duncan, 1994; Kuba *et al.*, 2006; Charlet *et al.*, 2008). En effet, l'injection d'alloprégnanolone entraîne une diminution de la réponse nociceptive induite par une stimulation mécanique viscérale (Winfree *et al.*, 1992). Plus tard, Frye et Duncan (1994) ont fait une évaluation exhaustive des propriétés de ces métabolites. En utilisant de multiples voies d'administration, ils ont injecté l'alloprégnanolone, le THDOC, la progestérone, la 5α -dihydroprogestérone (DHP), la 17-OH-progestérone, la DHEAS et la PregS et caractérisé la réponse nociceptive par le test de retrait de la queue. Ce test reflète particulièrement la réponse réflexe spinale à une stimulation douloureuse (Irwin *et al.*, 1951; Devor *et al.*, 1982; Carstens et Wilson, 1993). Cette étude a permis d'observer les effets antinociceptifs de l'alloprégnanolone, du THDOC, de la progestérone et du DHP (Frye et Duncan, 1994). De plus, d'autres expérimentations utilisant des stimulations nociceptives thermiques ont montré que l'effet des métabolites $3\alpha,5\alpha$ -réduits est potentialisé par l'estradiol (Frye et Duncan, 1996). Ces résultats n'ont cependant pas été reproduits par tous les groupes. En effet, Caba et ses collaborateurs (1994), ainsi que d'autres, n'ont pas pu mesurer de variation de la réponse nociceptive suivant l'injection de ces métabolites $3\alpha,5\alpha$ -réduits, mais ont plutôt mesuré une potentialisation du récepteur GABA_A, se traduisant par une augmentation de la réponse au muscimol (agoniste GABA_A) (Caba *et al.*, 1994; Uchida *et al.*, 2003).

L'effet antinociceptif des stéroïdes $3\alpha,5\alpha$ -réduits a aussi été mesuré dans des modèles de douleur inflammatoire, tels que ceux résultant de l'injection de carragénine et de formaline (Gilron et Coderre, 1996; Gambhir *et al.*, 2002; Charlet *et al.*, 2008; Ocvirk *et al.*, 2008). Cependant, ces résultats semblent hautement dépendants des concentrations de métabolites injectées, de même que de la concentration de formaline utilisée. Il est important de mentionner qu'une faible concentration de formaline (< 2,5%) est connue pour produire une douleur neurogénique alors qu'une concentration plus élevée agit par l'intermédiaire de mécanismes neurogéniques et inflammatoires (Sawynok et Liu, 2003). De plus, les faibles propriétés analgésiques peuvent être difficiles à observer lors de l'utilisation de fortes concentrations de formaline (> 5%).

Même si les effets antinociceptifs des métabolites $3\alpha,5\alpha$ -réduits sur des douleurs inflammatoires sont faibles, leurs effets sur les douleurs neuropathiques sont très importants. L'injection locale, intrathécale ou encore la stimulation de la neurostéroïdogénèse par l'étifoxine, un anxiolytique de la famille des benzoxazines liant la protéine de translocation (TSPO), peut soulager des hyperalgésies thermiques et mécaniques produites par la ligature du nerf sciatique ou des dommages neuropathiques induits par la vincristine (Pathirathna *et al.*, 2005b; Meyer *et al.*, 2008; Aouad *et al.*, 2009; Kondo *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2010). Ces différentes observations supportent fortement l'effet analgésique des stéroïdes neuroactifs dont l'action peut être en périphérie et au niveau central. Certaines études ont d'ailleurs suggéré que l'effet périphérique des stéroïdes neuroactifs se produit par l'inhibition des canaux calciques de type T et par la potentialisation des récepteurs GABA_A exprimés par les neurones sensoriels (Pathirathna *et al.*, 2005a; Pathirathna *et al.*, 2005b). L'injection de progestérone, de dihydroprogestérone et de tétrahydroprogestérone produisent tous une amélioration significative des neuropathies diabétiques caractérisée par une démyélinisation axonale (Veiga *et al.*, 2006). En effet, il a été décrit que la progestérone et ses métabolites ont des propriétés remyélinisantes, particulièrement par la stimulation de la prolifération des cellules de Schwann (Melcangi *et al.*, 2003). Cet effet de la progestérone et de la dihydroprogestérone

résulterait de l'amplification de l'expression génique de la protéine de myéline et de la glycoprotéine zéro (Melcangi *et al.*, 2000; Melcangi *et al.*, 2003).

La synthèse des neurostéroïdes peut être stimulée lors de douleurs neuropathiques (Patte-Mensah *et al.*, 2006; Leonelli *et al.*, 2007; Caruso *et al.*, 2008; Roglio *et al.*, 2008) ou inflammatoires (Poisbeau *et al.*, 2005). En utilisant un modèle de douleur par injection de carragénine, le laboratoire du Pr Poisbeau a montré qu'une douleur inflammatoire stimule la production de neurostéroïdes endogènes dans la moelle épinière des rats mâles (Poisbeau *et al.*, 2005). Plus précisément, l'activité enzymatique menant à la production d'allopregnanolone et de THDOC semble être particulièrement augmentée. Il a d'ailleurs été noté, suivant une inflammation à la carragénine, qu'une inhibition GABAergique soutenue était présente dans la moelle épinière et vraisemblablement produite par des neurostéroïdes (Poisbeau *et al.*, 2005). L'action intrinsèque de ce phénomène semble être une limitation des symptômes nociceptifs suivant une douleur importante. Celle-ci serait produite par une plasticité neuronale de la moelle épinière augmentant l'activité inhibitrice des interneurons GABAergiques. Un traitement par le finastéride, empêchant la synthèse endogène de neurostéroïdes, diminue significativement l'amplitude et la durée de l'hyperalgésie thermique associée à l'inflammation (Poisbeau *et al.*, 2005). Finalement, les métabolites 3α -réduits semblent produire un effet analgésique associé à la potentialisation des fonctions inhibitrices des récepteurs GABA_A de la moelle épinière. Par contre, les métabolites 3α -réduits ne produisent pas les mêmes effets analgésiques (Kavaliers et Wiebe, 1987; Charlet *et al.*, 2008).

2.3.2 Pregnenolone et pregnenolone sulfate

La pregnenolone (Preg) et la pregnenolone sulfate (PregS) lient principalement le récepteur glutamatergique NMDA et le récepteur sigma 1. De plus, ils peuvent aussi lier le récepteur GABA_A. Toutefois, leur affinité pour ce récepteur est beaucoup plus faible. Le mécanisme d'action de ces deux stéroïdes a été décrit de façon très générale, mais peu d'expérimentations confirment ses

effets directs sur la douleur. Certaines études décrivent un effet lors du test à la capsaïcine, cependant on suggère une liaison directe de la PregS au récepteur TRPV1 afin d'inhiber son courant (Chen et Wu, 2004; Borzan et Fuchs, 2006).

2.3.3 Estradiol et ses métabolites

Les estrogènes sont principalement synthétisés par les ovaires et par l'aromatase de la testostérone par les glandes surrénales. La découverte de l'enzyme de synthèse de l'estrogène P450 aromatasase dans le système nerveux central a suggéré une possible synthèse *de novo* dans le cerveau (Naftolin *et al.*, 1975; MacLusky *et al.*, 1994). De plus, les récepteurs de l'estrogène (ER α et ER β) sont aussi largement distribués dans tout le système nerveux central (Pfaff et Keiner, 1973; Amandusson et Blomqvist, 2001). Ces récepteurs nucléaires sont bien connus, et plus récemment des récepteurs membranaires ont aussi été observés (Kelly *et al.*, 1977; Pietras et Szego, 1977; Ronnekleiv et Kelly, 2005; Raz *et al.*, 2008). L'ER α est généralement impliqué dans les comportements sexuels, alors que l'ER β est plutôt décrit dans des régions du cerveau impliquées dans la perception de la douleur et la production de neuropeptides (Koch, 1990; Simerly *et al.*, 1990; Lauber *et al.*, 1991; Yuri et Kawata, 1991; Shughrue *et al.*, 1992; DonCarlos *et al.*, 1995; Handa *et al.*, 1996; Alves *et al.*, 1998a; Hrabovszky *et al.*, 1998; Osterlund *et al.*, 1998; Mitra *et al.*, 2003; Nomura *et al.*, 2003). Les deux récepteurs nucléaires (ER α , ER β) sont responsables d'une action différentielle des estrogènes dans le système nerveux central. Cet effet a d'ailleurs été démontré dans les voies de transmission et de modulation de la douleur, où l'estrogène peut avoir des effets à la fois excitateurs et inhibiteurs (Woolley et Schwartzkroin, 1998; Coulombe *et al.*, 2011b).

L'estradiol influence plusieurs neurotransmetteurs qui sont impliqués dans les mécanismes de transmission et de modulation de la douleur. En effet, l'estrogène et la progestérone modifient l'expression de plusieurs gènes associés au métabolisme de la sérotonine (Sumner et Fink, 1997, 1998). De plus, certaines études ont démontré qu'une supplémentation en estrogène chez des souris ovariectomisées augmente la synthèse et la recapture de la sérotonine. L'inverse

se produit lors du retrait de l'estrogène (Ladisich, 1974; Munaro, 1978; Crowley *et al.*, 1979; Cone *et al.*, 1981; Biegon *et al.*, 1983; Di Paolo *et al.*, 1983; Johnson et Crowley, 1983; Chomicka, 1986; Evrard, 2006). Puisque la sérotonine est un médiateur important de la voie inhibitrice descendante de la douleur, une synthèse plus importante pourrait augmenter l'activité de cette voie. L'estrogène influence aussi les neurones contenant du GABA. En effet, il permet la diminution du glutamate décarboxylase (GAD) (McEwen et Alves, 1999), l'enzyme permettant la synthèse du GABA, au niveau de certains noyaux des centres supérieurs. Puisque l'estrogène a un effet inhibiteur sur l'activité GABAergique, il est possible de suggérer une augmentation de la transmission au niveau des centres supérieurs. Cependant, la résultante concrète pourrait être une balance entre les effets produits par les centres supérieurs et la moelle épinière.

De nombreuses évidences démontrent aussi une modulation par l'estradiol des voies de signalisation opioïdiques. L'administration d'un bolus d'estradiol chez des femelles ovariectomisées produit entre autre une augmentation de la production d'enképhaline dans la moelle épinière (Amandusson *et al.*, 1996; Amandusson *et al.*, 1999). D'autres études ont démontré que l'estradiol provoque l'augmentation de la libération de peptides opioïdes dans le noyau supraoptique de l'hypothalamus des rats femelles (Sinchak et Micevych, 2001; Micevych *et al.*, 2003). Suite à l'activation des récepteurs opioïdes, une boucle de rétrocontrôle inhibitrice permet la modification de la densité des récepteurs opioïdes de type μ (MOR) à la surface de la cellule, ce qui entraîne, d'une part, une diminution de l'efficacité des peptides opioïdes et, d'autre part, une diminution de l'efficacité des contrôles impliquant ces voies d'activation, donc une augmentation de la douleur perçue (Amandusson *et al.*, 1999; Micevych et Sinchak, 2001). Finalement, un niveau élevé d'estrogènes est associé à une grande activation de la neurotransmission associée à la libération d'opioïdes, donc un effet antalgésique, tandis que des niveaux estrogéniques bas diminuent la signalisation par les peptides opioïdes, donc un effet proalgésique (Smith *et al.*, 2006).

En situation de douleur inflammatoire et de douleur aiguë, l'estradiol induit des effets antihyperalgésiques (Gaumont *et al.*, 2005; Kuba *et al.*, 2006; Coulombe *et al.*, 2011b). D'ailleurs, notre laboratoire a récemment démontré que le récepteur ER α serait impliqué dans la douleur aiguë, notamment lors de la première phase du test à la formaline (Coulombe *et al.*, 2011b). Chaban et ses collaborateurs (2003, 2005) ont démontré que l'estradiol, par sa liaison aux récepteurs ER α , pouvait inhiber l'activité des fibres afférentes nociceptive, et donc diminuer une réponse nociceptive aiguë (Chaban *et al.*, 2003). Cet effet de l'estradiol semblerait être associé à une inhibition rapide de la signalisation calcique (courant calcique entrant [Ca²⁺]_i) produite lors de la liaison de l'adénosine triphosphate (ATP) à son récepteur purinergique P2X (Chaban *et al.*, 2003). Il a été documenté que l'estrogène pouvait aussi diminuer les courants calciques par l'inhibition des canaux calciques voltages-dépendants de type L (Chaban *et al.*, 2003). Finalement, lors de douleurs viscérales, neuropathiques et postopératoires, l'estrogène semble avoir des propriétés antihyperalgésiques chez la souris (Bradshaw et Berkley, 2002; Sanoja et Cervero, 2005, 2008; Hubscher *et al.*, 2010; Sanoja et Cervero, 2010).

2.3.4 Testostérone et ses métabolites

La testostérone est un stéroïde synthétisé par les testicules et les glandes surrénales, mais il est aussi présent dans le système nerveux central. Ce stéroïde lie un récepteur nucléaire AR, mais il peut aussi avoir un effet neuroactif par l'activation de récepteurs membranaires. La testostérone a été décrite comme étant un modulateur positif du récepteur GABA_A et un modulateur négatif du récepteur 5HT₃ (Wetzel *et al.*, 1998; Rupprecht et Holsboer, 1999; Rupprecht, 2003; Dubrovsky, 2005). De plus, il peut être aromatisé en estradiol et activer les récepteurs de l'estrogène (Kawata, 1995).

La testostérone a généralement été décrite comme étant antinociceptive dans différents modèles de douleur. Il a longtemps été suggéré que son action se produisait grâce à sa liaison au récepteur nucléaire. Les nouvelles connaissances suggèrent sa liaison à des récepteurs membranaires, notamment au récepteur

GABA_A, NMDA (pour une liste exhaustive voir le Tableau 1). Cette information permet de supposer un effet de la testostérone sur la douleur par l'activation de ces récepteurs. La littérature rapporte que la castration des animaux mâles diminue la réponse nociceptive lors de plusieurs tests comportementaux (Forman *et al.*, 1989; Molina *et al.*, 1994; Pednekar et Mulgaonker, 1995; Frye et Seliga, 2001; Edinger et Frye, 2004). Cet effet de la castration est généralement renversé par l'injection de testostérone propionate (Forman *et al.*, 1989; Frye et Seliga, 2001; Edinger et Frye, 2004; Hau *et al.*, 2004). Aussi, lors de douleurs neuropathiques, la castration des souris augmente l'hyperalgésie découlant de la lésion nerveuse (Robichaud).

La testostérone a été associée à différentes pathologies de douleur chronique, particulièrement à la fibromyalgie et à l'arthrite (Dessein *et al.*, 1999; Straub et Cutolo, 2001). Aucune corrélation n'a pu être établie entre la sévérité des symptômes de la fibromyalgie, évalués par le *Fibromyalgia Impact Questionnaire* (FIQ), et les niveaux sanguins de testostérone chez des sujets atteints de fibromyalgie. Cependant, cette même équipe a tout de même relié les niveaux de testostérone à la fonctionnalité physique (Dessein *et al.*, 1999). Les injections de testostérone chez l'humain ont aussi montré des effets positifs chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde et d'algie vasculaire de la face (*cluster headaches*) (Klimek, 1985; Straub et Cutolo, 2001). Finalement, une étude a été effectuée chez des sujets transsexuels afin d'évaluer leur douleur avant et après leur traitement hormonal (Aloisi *et al.*, 2007). Sur les 26 sujets subissant une transformation de la femme vers l'homme (FtM), 14 présentaient une forme de douleur (53,8%) avant le changement de sexe. Après leur traitement, seulement 2 personnes sur 26 présentaient des douleurs (7,7%). À l'opposé, chez les transsexuels passant d'un statut homme à un statut femme (MtF), 3 sujets sur 47 présentaient des douleurs avant leurs traitements, alors que 11 sur 47 rapportaient la présence de douleur une fois le traitement terminé (Aloisi *et al.*, 2007).

La testostérone est métabolisée en dihydrotestostérone et en 3 α -diol par les enzymes 3 β -hydroxystéroïde déhydrogénase et la 5 α -réductase. Le 3 α -diol, comme les autres métabolites 3 α 5 α -réduits, est un modulateur positif du récepteur

GABA_A (Frye *et al.*, 1996). Il a été démontré que la testostérone possède des propriétés neuroprotectrices dans certains modèles de douleur neuropathique. En fait, il augmenterait la vitesse de conduction dans le nerf et diminuerait l'hyperalgésie produite par la streptozotocine (Roglio *et al.*, 2007). Les effets neurophysiologiques de cette molécule semblent être associés à l'activité de la pompe Na⁺,K⁺-ATPase, la densité des fibres afférentes et l'expression de la protéine myéline P0 dans le système nerveux périphérique (Roglio *et al.*, 2007).

2.3.5 DHEA et DHEAS

La DHEA et la DHEAS (qui seront présentées comme la DHEA(S) lorsque ces molécules seront mentionnées ensemble) sont considérées comme des androgènes (Maninger *et al.*, 2009). Ces molécules sont synthétisées principalement par les glandes surrénales (*zona reticularis*). Cependant, chez les femmes, 20% de la DHEA(S) est aussi produite par les ovaires (Nieschlag *et al.*, 1973; Havelock *et al.*, 2004; Maninger *et al.*, 2009). De plus, il a été décrit que la DHEA(S) peut aussi être produites par les cellules du système nerveux central et par la peau (Corpechot *et al.*, 1981; Kalimi *et al.*, 1994). Il est connu que la DHEAS est métabolisée en DHEA par la DHEA sulfatase, tandis que la DHEA peut être transformée en DHEAS par l'hydroxystéroïde sulfotransférase. Alors que la DHEAS est un modulateur positif de sigma 1 et un modulateur négatif de GABA_A, la DHEA est un modulateur positif du récepteur GABA_A.

À l'état basal, la DHEA(S) est présente en concentration supérieure chez l'homme comparativement à la femme et, tout comme la testostérone, diminue avec l'âge (Maninger *et al.*, 2009). Finalement, de faibles concentrations de DHEA(S) sont souvent associées à des troubles du sommeil, certaines formes de détresse psychologique et la présence de douleurs (Schell *et al.*, 2008; Maninger *et al.*, 2009).

Il est bien connu que la DHEA(S) fait partie d'une boucle de rétrocontrôle de la synthèse des glucocorticoïdes (Kalimi *et al.*, 1994). En effet, la synthèse de ces molécules est directement stimulée par la libération d'ACTH (Nieschlag *et al.*,

1973; Leowattana, 2004). Une étude a démontré que l'absorption orale de DHEA diminuait la concentration plasmatique de cortisol (Wolf *et al.*, 1997). En plus, les traitements antiglucocorticoïdes produisent une diminution des concentrations de DHEAS dans le sang (Rhodes *et al.*, 1996; George *et al.*, 2006). Certains suggèrent que de faibles concentrations de DHEAS sont le signe d'une hypofonction de l'axe HHS (Leowattana, 2004).

Quelques études ont examiné l'implication de la DHEAS sur la réponse nociceptive chez l'animal. En effet, l'injection spinale produit un effet précoce pronociceptif et un effet tardif antinociceptif (Kibaly *et al.*, 2008; Yoon *et al.*, 2009). L'effet pronociceptif de la DHEAS est associé à la fois à son effet agoniste sur le récepteur sigma 1 et à son effet antagoniste sur le récepteur GABA_A (Yoon *et al.*, 2009). De plus, il a été démontré que l'injection intraplantaire de DHEAS produit des symptômes douloureux inflammatoires, *e.g.* de l'hyperalgésie et une perméabilité vasculaire pouvant être renversées par un antagoniste du récepteur à l'histamine (H₁) (Uchida *et al.*, 2003).

Certaines études cliniques se sont intéressées à la relation entre la DHEAS et la perception de la douleur dans différentes pathologies de douleur chronique (Dessein *et al.*, 1999; Hasselhorn *et al.*, 2001; Finset *et al.*, 2004; Blackman *et al.*, 2007; Schell *et al.*, 2008; Kilts *et al.*, 2010). Il a été observé que les femmes présentant de faibles niveaux de DHEAS ont davantage de douleurs (Morrison *et al.*, 1998). D'autres études, de même qu'une effectuée au laboratoire, ont observé des concentrations plus faibles de DHEAS chez les sujets fibromyalgiques en comparaison de sujets sains (Coulombe *et al.*, 2010), de même que certaines corrélations avec la douleur rapportée par ces patients. En plus, un lien a été observé entre les faibles concentrations de DHEAS et la prédiction de douleur dans les 12 mois suivants chez des travailleurs (Schell *et al.*, 2008). Cette information est très importante afin de tenter de prédire le développement de douleurs chroniques. D'autres études ont plutôt corrélé les niveaux d'androgène à l'état de santé médiocre et à la faible qualité de vie des sujets (Dessein *et al.*, 1999; Finset *et al.*, 2004). Il a été observé qu'un supplément en DHEA pouvait renverser

cette corrélation et augmenter la qualité de vie des sujets, ainsi que diminuer leurs symptômes douloureux (Himmel et Seligman, 1999; Finckh *et al.*, 2005). Ces études, décrivant des effets antinociceptifs de la DHEA(S), sont très peu compatibles avec la littérature animale présentant plutôt des effets pronociceptifs de la DHEA(S). Ces disparités peuvent s'expliquer par un écart important des concentrations de DHEA(S) dans le sang entre le rongeur et l'humain (Corpechot *et al.*, 1981; Guazzo *et al.*, 1996). De plus, les études animales utilisent principalement la DHEA(S) injectée directement dans le système nerveux central, tandis que chez l'humain on parle généralement de DHEA(S) endogène et à quelques reprises de traitement par voie orale.

OBJECTIFS

Objectif général

Plusieurs études ont porté sur les causes et les mécanismes physiologiques soutenant les différences de perception de la douleur entre les hommes et les femmes, cependant, plusieurs questions restent irrésolues. L'objectif général de cette thèse est de mieux comprendre les différents facteurs impliqués dans la la perception de la douleur chez les hommes et les femmes; Évaluer leur importance dans les mécanismes de transmission et de modulation de la douleur; Cibler les éléments pouvant influencer la prévalence plus importance chez les femmes de certaines pathologies de douleur chroniques de même que l'évolution de leur symptômes

Objectif #1

Mieux comprendre les différents facteurs physiologiques, psychologiques et émotionnels influençant la différence de perception de la douleur chez l'humain.

Objectif #2

Mettre en relation les niveaux d'androgènes et de cortisol avec les symptômes cliniques et la perception de la douleur chez des sujets atteints de fibromyalgie et des volontaires sains.

Objectif #3

Évaluer l'implication des hormones gonadiques et de leurs métabolites 3α -réduits dans les voies ascendantes et descendantes de la douleur chez les mâles et les femelles.

CHAPITRE TRADITIONNEL

Ce projet intitulé « Différence de perception douloureuse et implication des facteurs psychologiques, émotionnels, et du système nerveux autonome lors d'une douleur thermique croissante tonique chez des hommes et des femmes : Une étude pilote » a été approuvé par le comité scientifique et le comité éthique de la recherche en santé chez l'humain du CHUS et de l'Université de Sherbrooke (**projet 12-109**).

1. Mise en contexte

En laboratoire, plusieurs études ont démontré que les femmes étaient plus sensibles à la douleur thermique expérimentale que les hommes. Il a été observé que celles-ci rapportaient des seuils de douleurs plus faibles, de même qu'une tolérance inférieure aux hommes (Fillingim *et al.*, 2009). Des travaux réalisés dans nos laboratoires ont permis de vérifier l'influence des hormones sexuelles dans la réponse nociceptive chez la souris et chez les rats. En effet, plusieurs de nos études ont démontré que les femelles étaient plus sensibles que les mâles vis-à-vis des stimulations douloureuses thermiques, mécaniques et chimiques (Gaumond *et al.*, 2002, 2005; Spooner *et al.*, 2007; Coulombe *et al.*, 2011a). Cependant, nous avons observé récemment qu'une douleur se mettant en place progressivement ne produit pas cette réponse typique dans une population de souris mâles et femelles. Nous avons montré qu'une douleur thermique produite par une température croissante à une vitesse de 2 degrés par minute (qui s'installe lentement et qui est soutenue) induit une réponse nociceptive plus rapidement chez les mâles que chez les femelles (Article #2). De plus, nous avons démontré que les hormones sexuelles influencent la réponse à cette stimulation puisque les animaux gonadectomisés présentent une réponse nociceptive plus tardive et diminuée.

Les avantages associés à l'utilisation d'une douleur tonique (d'une durée plus longue) plutôt que l'utilisation d'une douleur aiguë (de courte durée) est que

ce type de douleur mime de façon plus juste les douleurs cliniques. En effet, les douleurs cliniques s'étendent généralement sur une plus longue durée (Chen et Treede, 1985). Non seulement ce protocole permet d'obtenir un seuil de douleur plus précis (Treede *et al.*, 1998), mais il permet aussi l'évaluation subjective de l'aspect émotionnel associé à la douleur (Dixon *et al.*, 2004).

Plusieurs paramètres (Tjolsen *et al.*, 1991; Le Bars *et al.*, 2001; Dixon *et al.*, 2004) peuvent être impliqués pour tenter d'expliquer cette différence de réponse nociceptive tels que :

- L'épaisseur de la peau ;
- La microcirculation des tissus en contact avec la stimulation thermique ;
- Le nombre de fibres A δ et C ;
- La libération de neurotransmetteurs dans la moelle épinière ;
- L'activité de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien associée au stress ;
- La réponse émotionnelle produite par la douleur ;
- La réponse du système nerveux autonome.

Une hypothèse que nous avons suggérée d'après une expérimentation animale (voir article 2) est que la perception consciente de la douleur serait plus grande chez la femme que chez l'homme (seuil de douleur plus faible chez la femme). Cependant, l'activation supraspinale, notamment du système nerveux autonome, lors d'une douleur tonique serait alors produite différemment chez l'homme et la femme. Dans cette hypothèse, nous suggérons que l'homme aura une gestion active de la stimulation, représentée par une tachycardie légère associée à l'activation du système nerveux sympathique. La femme présenterait une gestion plus passive de la stimulation qui serait représentée par une bradycardie légère associée à l'activation du système nerveux parasympathique. La suggestion reprend l'idée d'une intégration émotionnelle, particulièrement vis-à-vis du stress appliqué, très différente entre les hommes et les femmes.

Cependant, une des grandes difficultés lors d'expérimentation animale est justement d'obtenir des informations quantitatives sur cette intégration

supraspinale, telles que 1) la perception du stress et la réponse émotionnelle, 2) l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, et celle du 3) système nerveux autonome. Par contre, chez l'humain, ces paramètres sont facilement mesurables par l'utilisation de questionnaires validés, de prélèvements salivaires de cortisol, la mesure du rythme cardiaque et de la pression artérielle.

Le transfert de ce modèle animal chez l'humain pourrait nous permettre de mieux interpréter les résultats obtenus avec cette méthode, ainsi que de mieux caractériser la différence de perception de la douleur entre les hommes et les femmes lors d'une douleur tonique s'installant lentement. Il est à noter que même si la littérature scientifique a généralement confirmé un rôle des hormones sexuelles dans la perception et la modulation de la douleur, les mécanismes impliqués dans cette modulation par les centres supraspinaux demeurent mal compris. Ceci peut être dû à la complexité des éléments considérés dans cette hypothèse, à savoir le phénomène de la douleur, la nature de la douleur, la complexité des fonctions des hormones et le fonctionnement du système nerveux.

2. Objectif de l'étude

2.1 Questions de recherche

- 1) Est-ce que la perception d'une douleur tonique thermique est la même chez l'homme que chez la femme?
- 2) Quelles sont les implications supraspinales lors de ce type de douleur? (réponse autonome, réponse de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, gestion émotionnelle de la douleur)

2.2 Objectif général

L'étude proposée a pour objectif d'évaluer, à l'aide d'approches psychophysiques, les relations entre la perception d'une douleur tonique thermique, l'activation du système nerveux autonome et l'intégration de la stimulation nociceptive chez des hommes et des femmes.

2.3 Objectifs spécifiques

- 1) Évaluer l'intensité, la tolérance et l'aspect désagréable reliés à une stimulation nociceptive thermique tonique entre les hommes et les femmes.
- 2) Comparer l'anxiété, la gestion de la douleur et la « catastrophisation » lors d'une stimulation nociceptive thermique tonique entre les hommes et les femmes.
- 3) Déterminer l'activité autonome suite à une douleur thermique tonique chez des hommes et des femmes : fréquence et variabilité cardiaque, pression artérielle, flot sanguin, température de la peau et sudation.
- 4) Décrire l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, par la mesure du cortisol salivaire, lors d'une douleur tonique thermique chez les hommes et les femmes.

3. Matériel et méthodes

3.1 Devis de l'étude

Afin de répondre à nos questions de recherche, nous avons fait une étude de type comparative descriptive. Nous proposons donc d'étudier 2 groupes, soit des groupes de sujets sains composé d'hommes et de femmes.

3.2 Population à l'étude

Quarante-deux sujets ont été recrutés, 21 hommes et 21 femmes, par méthode d'échantillonnage de convenance. Tous étaient en bonne santé et âgés entre 18 et 45 ans. Aucun sujet n'avait de pathologies métaboliques, neuropathiques ou de déficits cognitifs. Aucun sujet n'avait de diagnostic de maladies cardiovasculaires ou endocriniennes. Un sujet homme et un sujet femme avaient un diagnostic de dépression traité et stabilisé avec des antidépresseurs depuis plus d'un an. Aucun sujet ne consommait d'analgésiques de façon continue.

3.3 Variables et instruments de mesure

3.3.1 Groupe (variable indépendante)

La variable indépendante est le sexe, soit des sujets sains hommes et des sujets sains femmes.

3.3.2 Perception de la douleur (variable dépendante)

La variable dépendante principale de l'étude est la perception de la douleur. Afin de diviser les composantes sensorielles et émotionnelles de la douleur, nous avons demandé aux sujets d'évaluer l'intensité et l'aspect désagréable de la douleur. L'intensité de la douleur était évaluée à l'aide d'une échelle visuelle analogique (ÉVA), allant de 0 (aucune douleur) à 100 (douleur la plus intense que je puisse tolérer) pendant toute la stimulation nociceptive (Figure 16). À la fin de la stimulation douloureuse, le sujet évaluait sur une échelle verbale numérique l'aspect désagréable de la douleur ressentie. L'échelle visuelle analogique est un instrument de mesure grandement utilisé puisqu'il est sensible aux

petites variations de douleur et est facilement compréhensible par la majorité des sujets (Rosier *et al.*, 2002). Ces échelles permettent de dissocier les deux composantes de la douleur (Rainville *et al.*, 1999).

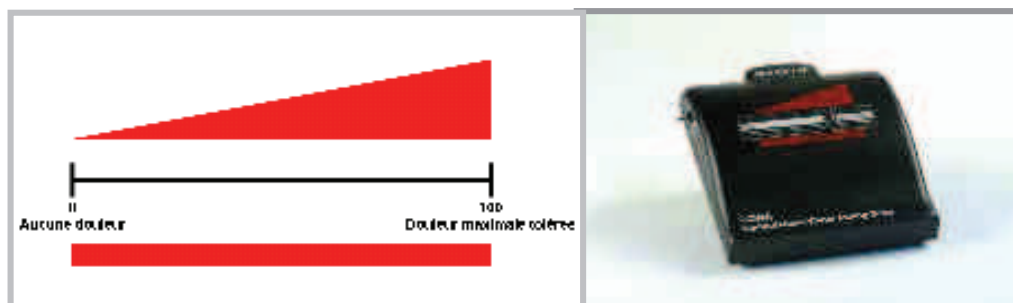


Figure 16. Échelle visuelle analogue

L'échelle visuelle analogique est un instrument de mesure de la douleur très précis qui implique à la fois des éléments visuels et nominaux afin de quantifier la douleur (image de gauche). L'échelle visuelle analogique électronique (CoVAS) permet l'évaluation de la douleur par une échelle visuelle analogique en temps réel et en continue (image de droite).

3.4 Mesure de la douleur: Test de la thermode

Les stimulations thermiques sont générées par une thermode de type Peltier de 9 cm² CHEPS (Neurosensory Analyser, Medoc Instruments) (Figure 17). Le test de la thermode est fait à deux reprises, selon deux protocoles différents, sur deux sites distincts de l'avant-bras. Dans un premier temps, le seuil de douleur et la tolérance au chaud sont mesurés en utilisant une rampe de température rapide (0,3°C/s) allant de 30°C à 50°C. Le seuil de douleur au chaud correspond à la température à laquelle le participant commence à ressentir de la douleur. Le seuil de tolérance au chaud correspond à la température maximale que le participant peut endurer. L'intensité de la douleur est mesurée tout au long du test avec la CoVAS. À la fin de cette stimulation nociceptive, le sujet évalue, à l'aide d'une échelle verbale numérique allant de 0 à 100, l'aspect désagréable global associé à la stimulation.



Figure 17. Thermode de type «CHEPS»

Thermode CHEPS (contact heat-evoked potential stimulator) standard d'un diamètre de 27 mm commercialisée par Medoc.

Le deuxième test consiste à évaluer le seuil de douleur et le seuil de tolérance d'une douleur tonique comparable à une douleur aiguë persistante. Pour ce faire, la stimulation thermique est produite par une rampe de température lente ($2^{\circ}\text{C}/\text{min}$) allant de 30°C à 46°C . Encore une fois, l'intensité de la douleur est évaluée avec la CoVAS. Lors de ce test, si le sujet n'a pas atteint son seuil de tolérance lorsque la thermode atteint la température de 46°C , la température demeure fixe jusqu'à l'obtention d'un seuil de tolérance ou à concurrence de 5 minutes à 46°C (pour un maximum de stimulation totale de 13 minutes). À la fin de cette stimulation nociceptive, le sujet évalue, à l'aide d'une échelle verbale numérique allant de 0 à 100, l'aspect désagréable global associé à la stimulation.

3.5 Activité du système nerveux autonome : Variabilité du rythme cardiaque

La mesure du rythme cardiaque est faite à l'aide d'un électrocardiogramme (ECG). À partir de l'ECG, le rythme cardiaque moyen est calculé, de même que plusieurs indices de la variabilité du rythme cardiaque (VRC). Ces indices sont :

- 1) La déviation standard des intervalles NN (SDNN) qui est une mesure générale de la VRC;
- 2) La racine carrée de la moyenne des différences des intervalles RR successifs au carré (RMSSD) et l'analyse spectrale de la VRC dans les

basses fréquences (LF) qui sont des mesures de l'activité parasympathique;

- 3) L'analyse spectrale de la VRC dans les hautes fréquences (HF) qui est une mesure de l'activité sympathique.

3.6 Flot sanguin :

Le laser doppler PeriScan PIM 3 (Perimed, Suède) permet de mesurer le flot sanguin de la microcirculation à la surface de la peau du site de la stimulation nociceptive. Cela donne un indice du niveau de vasoconstriction/vasodilatation des artérioles et des capillaires par la stimulation thermique, donc une approximation du tonus sympathique vasculaire produite par cette stimulation. Il s'agit d'une procédure non invasive et sans douleur. Le flot sanguin est évalué à l'état basal, après la rampe rapide et après la rampe lente à l'endroit où la thermode a été appliquée.

3.7 Activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

Des prélèvements salivaires sont faits avant et après l'expérimentation dans le but de doser le cortisol salivaire et d'obtenir un indice de l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysosurrénalien. Ce dosage a été effectué par le laboratoire de biochimie du CHUS sous la supervision de Guy Fink, PhD. Les prélèvements ont été effectués à l'aide d'une salivette et analysés par chromatographie en phase liquide couplée à un spectrophotomètre de masse en tandem (LC/MS/MS, *Liquid Chromatography coupled to tandem mass spectrometry*) (Cyr et Fink, 2009).

3.8 Mesures psychométriques

Les participants ont rempli différents questionnaires afin de mieux décrire l'échantillon expérimental. Certains questionnaires ont été remplis avant la session expérimentale et d'autres après dans le but de bien caractériser et différencier les états émotionnels avant et après les tests de douleur. Afin de diminuer la fatigue pouvant résulter de la concentration requise pour la réponse aux nombreux

questionnaires, ceux pouvant être remplis avant la séance expérimentale étaient transmis par courrier pour que le sujet puisse les remplir sur leur propre temps.

3.8.1 Questionnaires préexpérimentaux

- 1) Le **questionnaire de l'état de santé**. L'état de santé de tous les participants est mesuré à l'aide du questionnaire « Formulaire d'information démographique et de santé ». Ce questionnaire permet de s'assurer de l'admissibilité et d'avoir une vue d'ensemble de l'état de santé des sujets, notamment les antécédents médicaux et la médication. Ce questionnaire contient aussi des informations sociodémographiques (âge, scolarité, état civil, emploi, etc.)

- 2) **L'inventaire du tempérament et du caractère (ITC)** mesure la personnalité du participant selon 7 sphères (Cloninger *et al.*, 1993). Ce questionnaire est constitué de 240 questions de type vrai ou faux. La version française a été validée par Trudel et collaborateurs en 2001 (Trudel *et al.*, 2001). Plusieurs traits de personnalité ont été corrélés à la perception de la douleur et au développement de pathologie de douleur chronique dans le passé (Aoki *et al.*, 2004; Mongini *et al.*, 2005; Sanchez-Roman *et al.*, 2007; Miettunen *et al.*, 2008).

- 3) **L'inventaire de dépression de Beck (IDB)** mesure l'état dépressif du participant. Il s'agit de l'un des instruments les plus utilisés pour mesurer la sévérité de l'état dépressif (Gallagher *et al.*, 1982). Il est connu que le statut émotionnel est un important facteur psychosocial impliqué dans la douleur (Chapman et Gavrin, 1999). La validité et la fidélité de cet instrument de mesure sont d'ailleurs bien démontrées (Beck *et al.*, 1988).

- 4) Pour évaluer **l'auto description du rôle social selon le sexe**, l'inventaire des rôles sexués de Bem (BSRI ou *Bem Sex Role Inventory*) a été utilisé. Ce questionnaire a été élaboré en 1971 par le Dr Sandra Lipsitz Bem, comprenant 60 caractéristiques de la vie sociale souvent utilisée pour

explorer la perception des rôles des hommes et des femmes dans la société. Pour chaque caractéristique, 7 possibilités sont proposées pour décrire au mieux son opinion (1 = jamais, 2 = rarement, 3-4-5 = neutre, 6 = souvent, 7 = toujours) (Bem, 1974).

- 5) Une version française du *Gender Role Expectation of Pain* (GREP) a aussi été remplie afin de mesurer la **perception de la douleur selon les attentes sociales de chaque sexe**. Ayant de très bonnes qualités métrologiques, ce questionnaire comportant 12 questions est utilisé pour explorer les différences de perception de la douleur entre les hommes et les femmes dans la société (Robinson *et al.*, 2001).

- 6) L'**inventaire sur le contrôle de soi** (ICS) a pour objectif d'évaluer les capacités reliées au contrôle de soi dans le maintien à long terme d'un comportement lié à la santé (Rosenbaum, 1980b, 1980a). En d'autres termes, la personne évalue ses tendances personnelles à utiliser des méthodes d'autocontrôle pour gérer des sensations physiologiques et émotionnelles. Il est composé de 36 énoncés dont le répondant indique jusqu'où les énoncés s'appliquent à lui (-3 : «très différent de moi, extrêmement non descriptif» à +3 : «très semblable à moi, extrêmement descriptif»). La version francophone du questionnaire a été validée en 1995 par Lévesque et ses collaborateurs (Lévesque *et al.*, 1995). Ceux-ci ont décrit que les personnes obtenant un résultat supérieur à 24 ont tendance à mieux gérer leurs émotions et leurs réactions physiologiques par des techniques d'autogestion cognitives et d'autosuggestion. La version française du *Self-Control Schedule* possède de bonnes qualités psychométriques et semblables à celles de la version anglaise.

- 7) L'**échelle de « catastrophisation » de la douleur** (ECD) permet d'évaluer le comportement catastrophisant du sujet face à la douleur dans la vie de tous les jours. La « catastrophisation » face à la douleur est une orientation psychologique où la personne a tendance à porter toute son attention sur

les symptômes de la douleur et à en amplifier la menace (Pavlin *et al.*, 2005). Dans un contexte où il est connu que les attentes ont une influence sur la perception de la douleur (Goffaux *et al.*, 2007), cette caractéristique devient importante à mesurer. Pour ce faire, nous avons utilisé l'échelle de « catastrophisation » face à la douleur qui est couramment utilisée dans nos recherches et dont la fidélité et la validité ont été démontrées (Sullivan, 1995).

- 8) **L'inventaire d'anxiété situationnelle et de trait d'anxiété (IASTA Y1 et Y2)** permet d'évaluer l'anxiété du moment (situationnelle) ainsi que l'anxiété en général (trait d'anxiété) (Spielberger et Vagg, 1984). L'anxiété situationnelle se définit comme un état émotionnel transitoire, caractérisé par un sentiment subjectif et conscient de tensions, d'appréhensions, de nervosité, d'inquiétudes et d'une augmentation de l'activité du système nerveux autonome (Spielberger et Vagg, 1984). Cette mesure varie selon la situation vécue. Il est pertinent, dans un contexte de douleur, d'évaluer ces caractéristiques, car l'anxiété peut exacerber la perception de la douleur (Chapman et Gavrin, 1999). L'inventaire d'anxiété situationnelle, tout comme des traits anxieux, est l'un des questionnaires les plus utilisés pour mesurer ces variables et possède d'excellentes qualités psychométriques (Gauthier et Bouchard, 1993). Il se démarque des autres questionnaires par la distinction qu'il fait entre le trait de personnalité et la réaction d'anxiété liée à une situation. Une échelle visuelle analogue pour évaluer l'anxiété du moment a également été utilisée avant la séance expérimentale.

3.8.2 Questionnaires postexpérimentaux

- 1) Une version française du **McGill Pain Questionnaire** (MPQ) a été utilisée composé de 20 items divisés en quatre catégories: 1- sensorielle (items 1 à 10), 2- affective (items 11 à 15), 3- évaluative (item 16) et 4- catégorie indéterminée ou variée (items 17-20) (Melzack, 1975, 2005). Pour chacune de ces catégories, le sujet identifie le ou les adjectifs correspondant le

mieux à la douleur ressentie. L'utilisation de ce questionnaire ajoute une dimension subjective à l'évaluation de la douleur quantitative recueillie lors du test.

- 2) **Échelle de « catastrophisation » situationnelle (ECS)** : Cette échelle correspond à une version modifiée de l'échelle de « catastrophisation » de la douleur (voir ci-haut ECD). La syntaxe de six questions a été modifiée afin de les rendre spécifiques à la stimulation nociceptive vécue. Cette approche a été utilisée lors de différentes expérimentations dans le passé (Edwards *et al.*, 2006; Campbell *et al.*, 2010). Les six questions utilisées représentent les trois dimensions primaires de la « catastrophisation » : la rumination, l'amplification et l'impuissance. La « catastrophisation » situationnelle par rapport à la douleur est mesurée par la sommation des six éléments.

- 3) Une version modifiée de l'**inventaire d'anxiété situationnelle (IASTA Y1 modifié)** a été utilisée afin d'évaluer l'anxiété par rapport au test au laboratoire (Spielberger et Vagg, 1984). Tout comme pour l'échelle de « catastrophisation » situationnelle de la douleur, la syntaxe des phrases du IASTA Y1 a été ajustée afin de convenir à l'évaluation de l'anxiété à un moment précis. Une échelle visuelle analogue afin d'évaluer l'anxiété du moment a également été utilisée après la stimulation douloureuse.

- 4) Le ***coping strategies questionnaire*** de Rosenstiel et Keefe (CSQ) est l'outil le plus fréquemment utilisé pour évaluer les stratégies d'adaptation spécifiques à la douleur (Rosenstiel et Keefe, 1983). La validité de l'adaptation française du CSQ a été effectuée par Irachabal et ses collaborateurs en 2008 (Irachabal *et al.*, 2008). Ce questionnaire comporte 21 questions qui sont notées par le sujet « jamais », « parfois », « souvent » et « toujours ». Il permet d'identifier à l'aide d'un modèle à six facteurs la distraction, la dramatisation, l'ignorance, la prise de distance, la stratégie d'autocontrôle et la prière.

3.9 Schéma expérimental

Ordre	Test	Durée
1	Explication et signature du formulaire de consentement	5 min
2	Questionnaires	90 min
3	Mesures électrophysiologiques de base	10 min
4	Mesure du flot sanguin	5 min
5	Prélèvement salivaire	5 min
6	Familiarisation avec la thermode	15 min
7	Stimulation thermique rapide	2 min
8	Prélèvement salivaire	5 min
9	Mesure du flot sanguin	5 min
10	Stimulation thermique lente	13 min
11	Prélèvement salivaire	5 min
12	Mesure du flot sanguin	5 min
13	Questionnaires	10 min
	Temps total de la rencontre	3 heures

Tableau 6. Séance expérimentale

Descriptif d'une séance expérimentale type tel que décrit dans le formulaire de consentement signé par le participant. Il est important de noter que le sujet a déjà été contacté par téléphone ou par courriel. Lors de cette communication antérieure le projet de recherche lui a été présenté et le rendez-vous a été cédulé. Le formulaire de consentement et plusieurs questionnaires sont remis au participant avant la séance expérimentale afin qu'il puisse lire et remplir les documents à son aise et à la vitesse qui lui convient. Le temps total réel de la rencontre était approximativement de 90-120 minutes.

3.10 Analyse statistique

3.10.1 Devis descriptif comparatif

Afin de répondre au premier objectif et de comparer les différentes variables dépendantes en fonction du sexe, des tests *t* de Student ont été faits pour

comparer les moyennes des deux groupes pour les différentes variables (évaluation de la douleur, mesure du SNA, questionnaires). Des ANCOVA sont aussi utilisés afin de déterminer l'implication de certaines variables.

3.10.2 Devis descriptif corrélational

Afin de déterminer quelles variables sont impliquées dans la perception de la douleur, des corrélations de Pearson ont été effectuées afin de déterminer s'il y a une association entre les différentes variables dépendantes. Des régressions linéaires hiérarchiques ont aussi été effectuées afin de décrire l'implication de certaines variables.

4. Résultats

4.1 Description de l'échantillon

4.1.1 Description sociodémographique des sujets

La population étudiée lors de cette expérimentation est composée majoritairement d'étudiants ou de travailleurs au CHUS Fleurimont, tous recrutés entre septembre et décembre 2012. La description des deux groupes est présentée dans le Tableau 7. Des tests *t* de Student ont été effectués afin de comparer les moyennes (les différentes valeurs analysées étaient distribuées normalement selon le test de Shapiro-Wilk, $p > 0,05$). Les regroupements catégoriques ont été comparés à l'aide d'un test de *Chi-carré*.

4.1.2 Description de la personnalité, de l'humeur et du genre

Les différents traits de personnalité et de l'humeur ont été comparés entre les hommes et les femmes (Figure 18 et Figure 19). Puisque plusieurs variables n'étaient pas distribuées normalement (test de Shapiro-Wilk, $p > 0,05$) les comparaisons ont été évaluées par le test non paramétrique de Mann-Whitney. Les résultats montrent que les femmes ont des scores de tempérament d'évitement du danger et de dépendance à la récompense plus élevés (Figure 18A). Il est possible d'observer une différence d'expression du genre et de ses composantes dérivées entre les hommes et les femmes (Figure 18B). En effet, le score de masculinité est plus élevé chez les hommes, cependant aucune différence n'est notable quant au score de féminité. Le score brut du genre diffère aussi entre les sexes. Ce score représente à la fois la féminité (score négatif) et la masculinité (score positif). On peut voir que le genre semble correspond au sexe. En effet, les femmes semblent présenter un score négatif (féminin) alors que les hommes semblent décrire un score positif (masculin), cependant lors de l'analyse à l'aide du test *t* de Student, ni le score des femmes ni celui des hommes n'est statistiquement différent de zéro. Par contre, lorsque l'on demande au participant sur une échelle de 1 à 7 combien il/elle est féminin(e) ou masculin(e), les hommes se décriront plus masculins que les femmes, et ces dernières se décriront plus féminines que les hommes. Finalement, aucune relation n'est observée quant à l'estime de soi entre les

hommes et les femmes. Aucune différence de l'humeur n'est présente entre les hommes et les femmes en ce qui a trait à l'anxiété, la dépression, la « catastrophisation » et le contrôle de soi (Figure 19A). Lorsque l'on compare les stratégies de gestion de la douleur, on observe que les hommes vont davantage utiliser des stratégies actives d'ignorance de la douleur (Figure 19B).

4.1.3 Les attentes par rapport à la douleur en fonction du sexe

Les attentes par rapport au rôle du sexe et du genre dans la douleur ont été évaluées chez les hommes et les femmes (Figure 20). Ce questionnaire tentait d'évaluer les attentes d'une personne par rapport à la perception de la douleur entre les hommes et les femmes. C'est-à-dire que les participants devaient comparer, sur une échelle de 0 à 10 (0: beaucoup moins grand, 10: beaucoup plus grand), la douleur des hommes et des femmes. Dans un premier temps, un test *t* de Student a été effectué afin de déterminer si, dans un groupe étudié, les scores obtenus étaient différent de 5 (égalité entre les hommes et les femmes). Ensuite, puisque plusieurs variables n'étaient pas distribuées normalement (test de Shapiro-Wilk, $p < 0,05$) les comparaisons inter-groupes ont été évaluées par le test non paramétrique de Mann-Whitney.

Les résultats montrent (Figure 20A) que les participants décrivent une sensibilité plus faibles des hommes en comparaison des femmes (les femmes: $p = 0,0317$; les hommes: $p = 0,0675$). Cependant, aucune différence significative n'a été observé lorsqu'on leur demandait de décrire la sensibilité à la douleur d'une femme en comparaison d'un homme (les femmes: $p = 0,1816$; les hommes: $p = 0,1516$). Concernant la tolérance à la douleur, seul les participants mâles ont mentionné que les hommes avaient une tolérance plus grande à la douleur que les femmes (les femmes: $p = 0,5325$; les hommes: $p = 0,0283$) et que ces dernières présentaient une tolérance à la douleur inférieure en comparaison des hommes (les femmes: $p = 0,5185$; les hommes: $p = 0,0050$). Tous les participants ont jugé que la volonté de parlé de la douleur d'un homme était inférieure à celle d'une femme (les femmes: $p < 0,0001$; les hommes: $p < 0,0001$) et que les femmes avaient une volonté de parler de leur douleur supérieure à celle des hommes (les femmes:

$p = 0,0002$; les hommes: $p = 0,0014$). Finalement, aucune différence significative concernant les attentes socioculturellement véhiculées n'était présente entre les hommes et les femmes (Figure 20A).

Lorsque les gens se comparent eux-mêmes à la majorité des hommes ou des femmes (Figure 20B), les hommes diront qu'ils sont plus tolérants à la douleur que la majorité des femmes ($p = 0,0028$), mais aussi des hommes ($p = 0,0069$). Cette affirmation n'est cependant pas vraie pour la sensibilité à la douleur. Les femmes rapportent plutôt être ni plus ni moins sensibles ou tolérantes à la douleur que les autres hommes ou femmes ($p > 0,05$). En ce qui concerne la volonté de parler de leur douleur, les hommes (et non significativement les femmes aussi, $p = 0,0558$) se décriront avec une moins grande volonté en comparaison des femmes en général ($p = 0,0066$), alors que les participantes se décriront avec une plus grande volonté à parler de leur douleur que les hommes ($p = 0,0091$). Une différence significative entre les groupes est observée seulement lorsque la comparaison est faite par rapport à la tolérance d'un homme typique (Figure 20B).

	Homme (n=21)	Femme (n=21)	<i>p</i>
Âge (ans)	26,86 ± 3,45	25,43 ± 4,94	0,284
IMC	24,57 ± 3,37	22,11 ± 3,09	0,018*
Contraception			
Aucun	N/A	6 (28,6%)	N/A
CH cyclique		8 (38,1%)	
CH continue		7 (33,3%)	
Origine			
Caucasienne	21 (100%)	20 (95,8%)	0,311
Asiatique	0 (0%)	1 (4,8%)	
Religion			
Aucun/Athée	12 (57,1%)	7 (33,3%)	0,218
Catholique/chrétienne	9 (42,9%)	14 (66,7%)	
Pratiquant	1 (4,8%)	2 (9,5%)	0,549
Non pratiquant	20 (95,2%)	19 (90,5%)	
Scolarité			
Secondaire	1 (4,8%)	0 (0%)	0,174
Collégiale	4 (19%)	9 (42,9%)	
Universitaire	16 (76,2%)	12 (57,1%)	
Situation actuelle			
Étudiant	17 (81%)	18 (85,7%)	0,526
Temps-Partiel	1 (4,8%)	0 (0%)	
Temps Plein	2 (9,5%)	3 (14,3%)	
Sans emploi	1 (4,8%)	0 (0%)	
Main dominante			
Droitier	18 (85,7%)	21 ± 0	0,072
Gaucher	3 (14,3%)	0 ± 0	
Sport par semaine (heures)	4,8 ± 4,13	3,43 ± 2,13	0,186
Fumeur			
Oui	4 (19%)	2 (9,5%)	0,378
Non	17 (81%)	19 (90,5%)	
Consommation alcool			
Jamais	1 (4,8%)	1 (4,8%)	0,023*
Parfois	8 (38,1%)	18 (85,7%)	
Souvent	12 (57,2%)	2 (9,5%)	
Café par jour (habituel, nombre)	1,38 ± 1,04	1,07 ± 1,47	0,435
Expérience douloureuse passée			
Oui	18 (85,7%)	18 (85,7%)	1,000
Non	3 (14,3%)	3 (14,3%)	
Douleur persistente passée			
Oui	12 (57,1%)	9 (42,9%)	0,355
Non	9 (42,9%)	12 (57,1%)	

Tableau 7. Description sociodémographique des populations à l'étude

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type ou en nombre de sujets (pourcentage de la population). Lors de comparaisons de moyenne un test *t* de Student a été utilisé. Lors de comparaisons de fréquence un test du Chi² a été utilisé. CH: contraceptif hormonal (pris en continue ou avec temps arrêt/cycle).

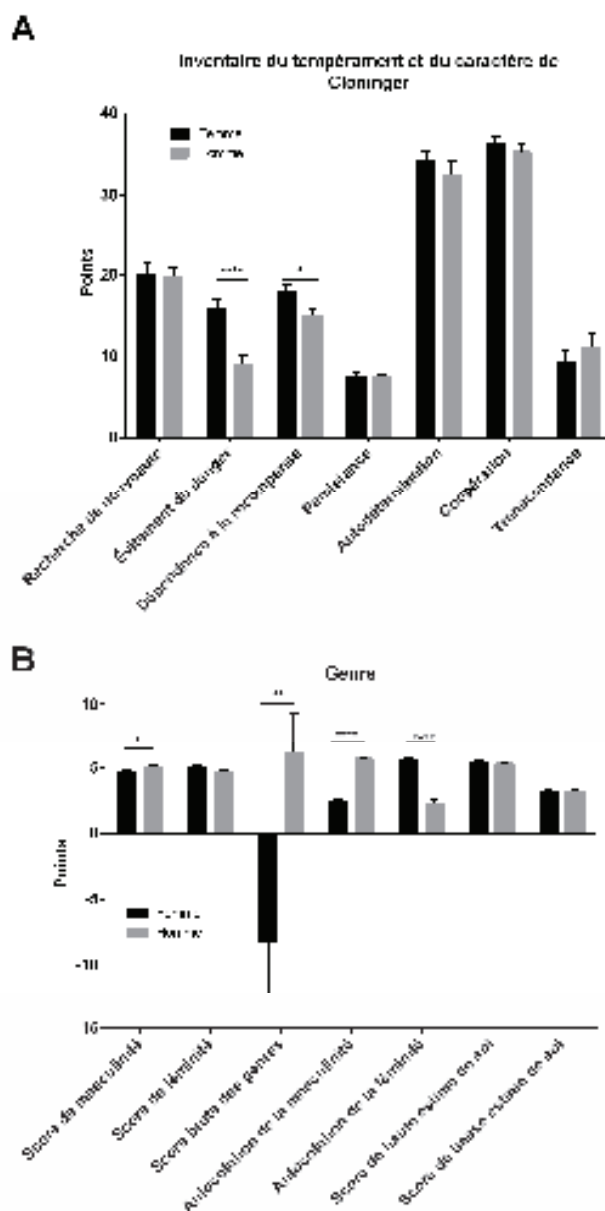


Figure 18. Description du tempérament, du caractère et du genre des des hommes et des femmes participants à l'étude

Histogrammes comparant les hommes (bandes claires) aux femmes (bandes foncées) représentant A) les différents tempéraments et caractères évalués par le test de personnalité de Cloninger; B) les composantes du genre; Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur-type. Les comparaisons sont faites en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p = 0,001$; ****: $p < 0,001$.

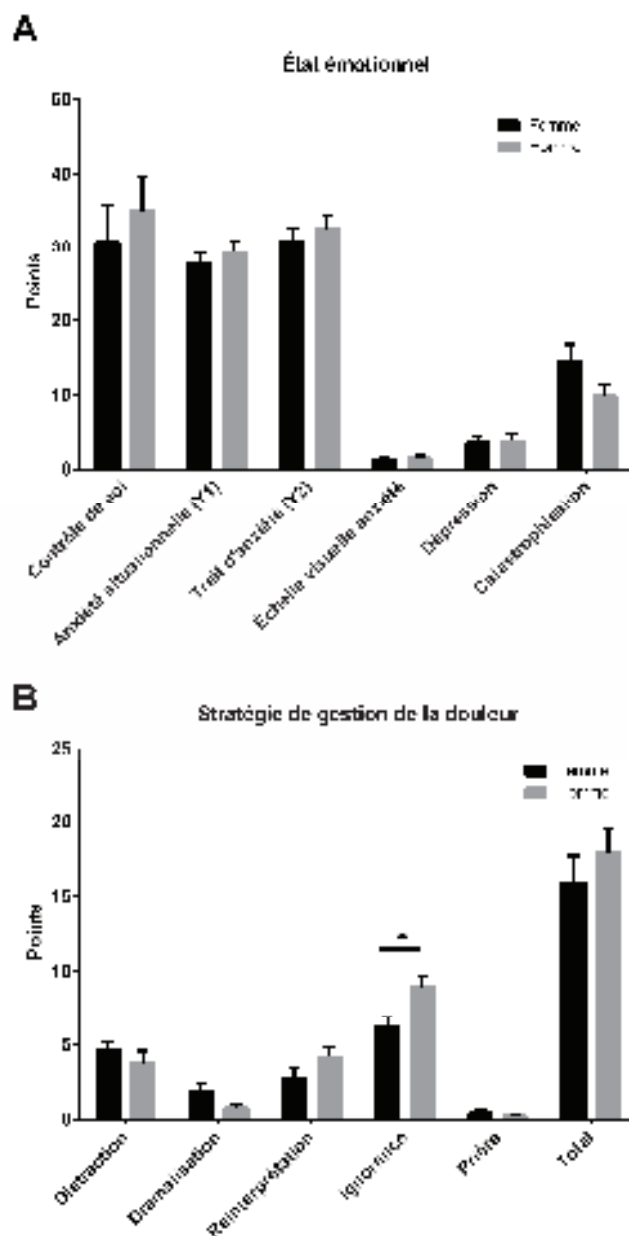


Figure 19. Comparaison de l'état émotionnel et des stratégies de gestion de la douleur entre les hommes et les femmes

Histogrammes comparant les hommes (bandes claires) aux femmes (bandes foncées) représentant A) les différentes composantes de l'état émotionnel, telles que le contrôle de soi, l'anxiété et la « catastrophisation »; B) les stratégies de gestion de la douleur. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur-type. Les comparaisons sont faites en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p = 0,001$; ****: $p < 0,001$.

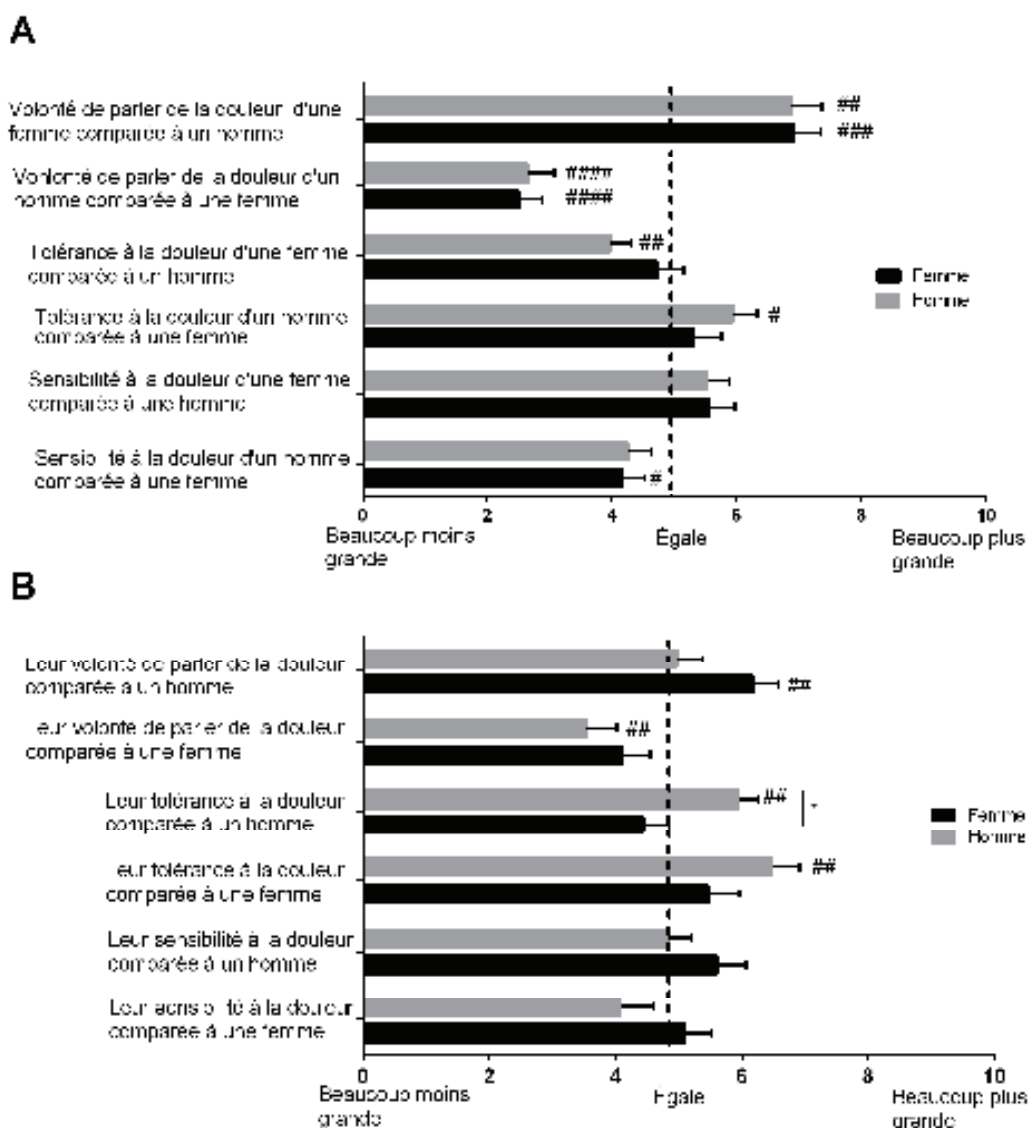


Figure 20. Rôle du sexe dans les attentes envers la douleur

Histogrammes comparant les hommes (bandes claires) aux femmes (bandes foncées) représentant les résultats du questionnaire rôles du sexe dans les attentes envers la douleur. A) Les attentes socioculturellement véhiculées; B) les attentes représentant leur auto-évaluation de la douleur par rapport à un homme ou une femme typique. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur-type. Les comparaisons entre les groupes sont faites en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$. Un test t de Student a été effectué afin de tester l'égalité des moyennes par rapport à une valeur donnée (valeur hypothétique = 5). #: $p < 0,05$; ##: $p < 0,01$; ###: $p < 0,001$; ####: $p < 0,0001$.

4.2 Perception de la douleur chez les hommes et les femmes

4.2.1 Différence de réponse à une stimulation nociceptive chez les hommes et les femmes

Dans un premier temps, les seuils de douleur et de tolérance ont été comparés chez les hommes et les femmes en utilisant un test de Mann-Whitney (test de Shapiro-Wilk, $p < 0,05$). Autant lors de la rampe rapide que lors de la rampe lente, les femmes ont rapporté un seuil de douleur inférieur à celui des hommes et une tolérance diminuée (Figure 21A-B). Étonnamment, l'aspect désagréable de la douleur était supérieur chez les hommes en comparaison des femmes (Figure 21C). Cette différence ne semble pas non plus être associée au temps de stimulation ni à l'ÉVA maximum atteint (ANCOVA, covarié pour le temps à la tolérance et le maximum atteint, $F = 9,258$, $p = 0,004$, η^2 partiel = 0,205). La comparaison de l'aspect désagréable entre la rampe rapide et la rampe lente a été faite chez les hommes et chez les femmes par un test des rangs signés de Wilcoxon. Dans les deux groupes, la variation de l'aspect désagréable entre la rampe rapide et la rampe lente est observée. Cependant, on mesure une augmentation de l'aspect désagréable lors de la rampe lente chez les femmes (moyenne \pm erreur-type: $30,71 \pm 4,88$ vs. $41,90 \pm 6,19$, $p = 0,005$), alors que l'on mesure une diminution de l'aspect désagréable lors de la rampe lente chez les hommes (moyenne \pm erreur-type: $47,00 \pm 5,87$ vs. $34,31 \pm 6,22$, $p = 0,038$). Finalement, autant lors de la rampe lente que de la rampe rapide, les femmes ont rapporté une douleur supérieure par rapport aux hommes (le maximum atteint, c'est-à-dire la plus haute douleur rapportée au cours du test, était supérieur).

4.2.2 Différence de perception de la douleur entre les hommes et les femmes

Lorsque l'on a demandé aux participants de nous dire comment ils avaient vécu la stimulation nociceptive produite par la rampe lente, il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les hommes et les femmes. Par contre, les femmes présentaient une légère tendance dans le choix des mots qui qualifiait la douleur qu'elles avaient ressentie (Figure 22A). Cependant, l'anxiété

et la « catastrophisation » produites par la stimulation n'étaient pas différentes chez les hommes et chez les femmes (Figure 22B).

4.2.3 Différence de réactivité du système nerveux autonome

La réactivité du système nerveux autonome a été évaluée en utilisant l'étude de la variabilité du rythme cardiaque (VRC). Les comparaisons entre les hommes et les femmes ont été faites par des tests de Mann-Whitney (test de Shapiro-Wilk, $p < 0,05$). Dans un premier temps, aucune différence de VRC n'est observée entre les hommes et les femmes au repos (Figure 23). En situation douloureuse (lors de la rampe lente, mesurée pendant les 5 dernières minutes), les hommes ont des mesures de basses fréquences (LFnu, modulation sympathique du SNA) plus élevées et des mesures de hautes fréquences (HFnu, modulation parasympathique du SNA) moins élevées que les femmes (Figure 24A). Au final, ce résultat est globalement représenté par un ratio LF/HF (balance sympathovagale) plus élevé chez les hommes. Ainsi, les hommes ont une réactivité sympathique du SNA plus élevée que les femmes pendant une situation douloureuse. Lorsque l'on compare les résultats mesurés pendant toute la stimulation lente, uniquement chez les participants ayant complété la rampe en entier, les résultats demeurent semblables (résultat non présenté). Par la suite, la variation de l'activité du SNA en situation nociceptive par rapport à l'état basal a été mesurée ($(\text{Nociceptif-Basal})/\text{Basal} \times 100$) (Figure 24B). Des tests t de Student ont permis de mesurer si cette variation est significative (valeur hypothétique = 0). Les résultats obtenus ont montré que les variations du SNA sont significatives uniquement chez les hommes (SDNN: $p = 0,0218$; RMSSD: $p = 0,0145$; LF(nu): $p = 0,0125$; ratio LF/HF: $p = 0,0128$). Aucune variation significative n'est présente chez les femmes. Lorsque les variations en pourcentage sont comparées entre les hommes et les femmes, certaines tendances sont présentes, cependant la différence entre les ratios LF/HF est la seule qui soit statistiquement significative. C'est-à-dire qu'en situation douloureuse les hommes ont une réactivité du système nerveux sympathique beaucoup plus importante que les femmes.

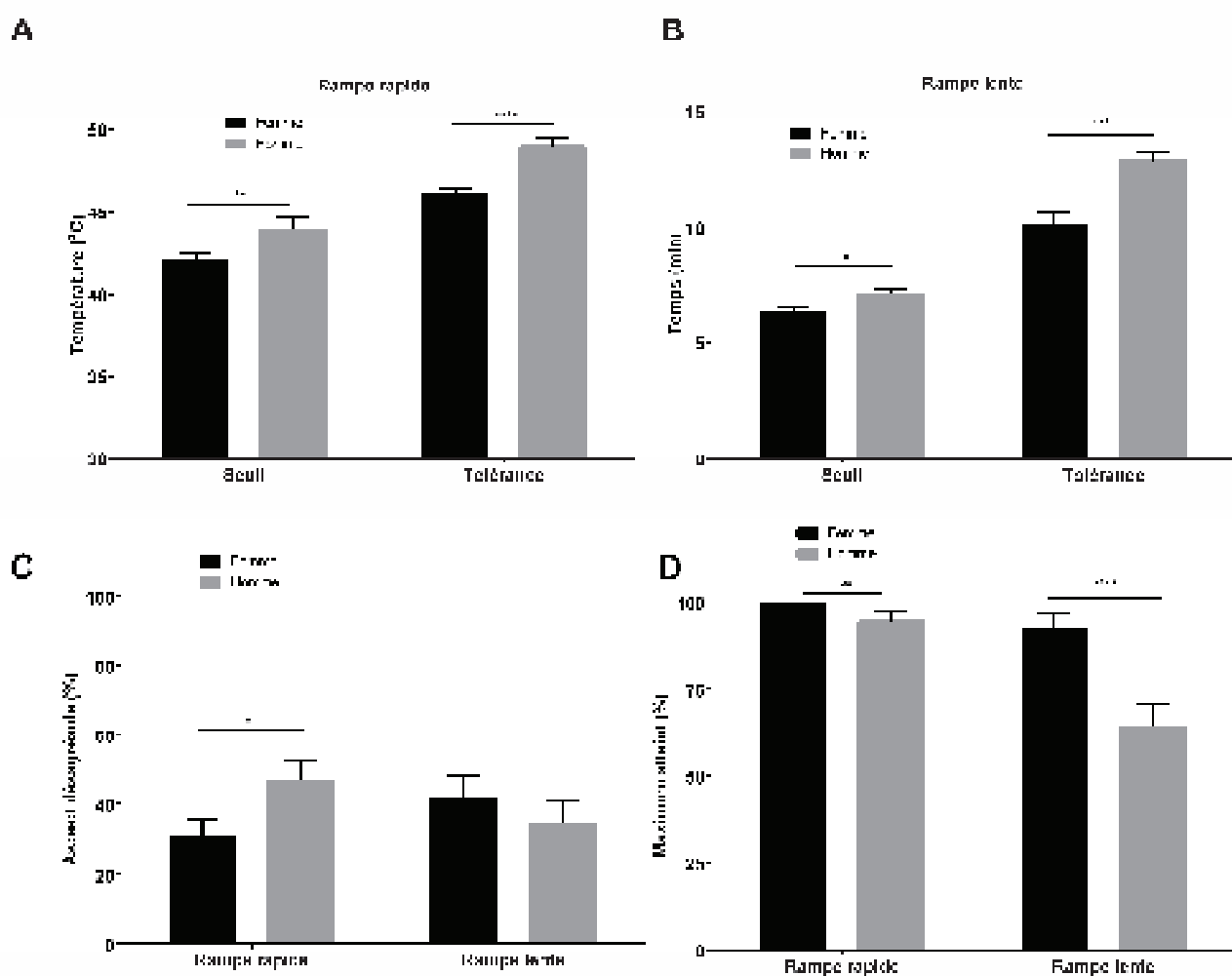


Figure 21. Douleur rapportée lors de la rampe rapide et de la rampe lente

Histogrammes comparant la douleur des hommes (bandes claires) et des femmes (bandes foncées). A) Seuil et tolérance à la douleur lors de la rampe rapide; B) Seuil et tolérance à la douleur lors de la rampe lente; C) aspect désagréable de la douleur lors de la rampe rapide et lente; D) maximum de douleur atteint sur une ÉVA lors de la rampe rapide et lente. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur-type. Les comparaisons sont faites en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p = 0,001$; ****: $p < 0,001$.

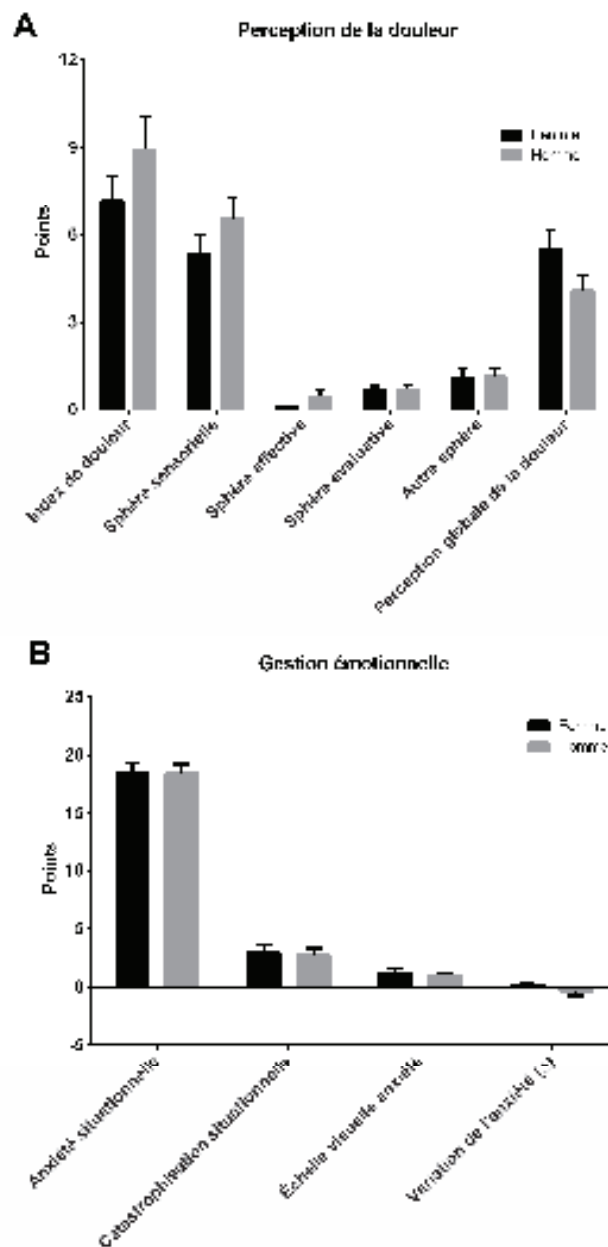


Figure 22. Perception de la douleur et gestion émotionnelle

Histogrammes comparant la perception de la douleur des hommes (bandes claires) et des femmes (bandes foncées) lors de la rampe lente. A) Utilisation de qualificatifs (MPQ) appartenant à différentes sphères de perception de la douleur; B) Gestion émotionnelle vécue pendant la stimulation lente. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur-type. Les comparaisons sont faites en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney. Aucune différence statistiquement significative.

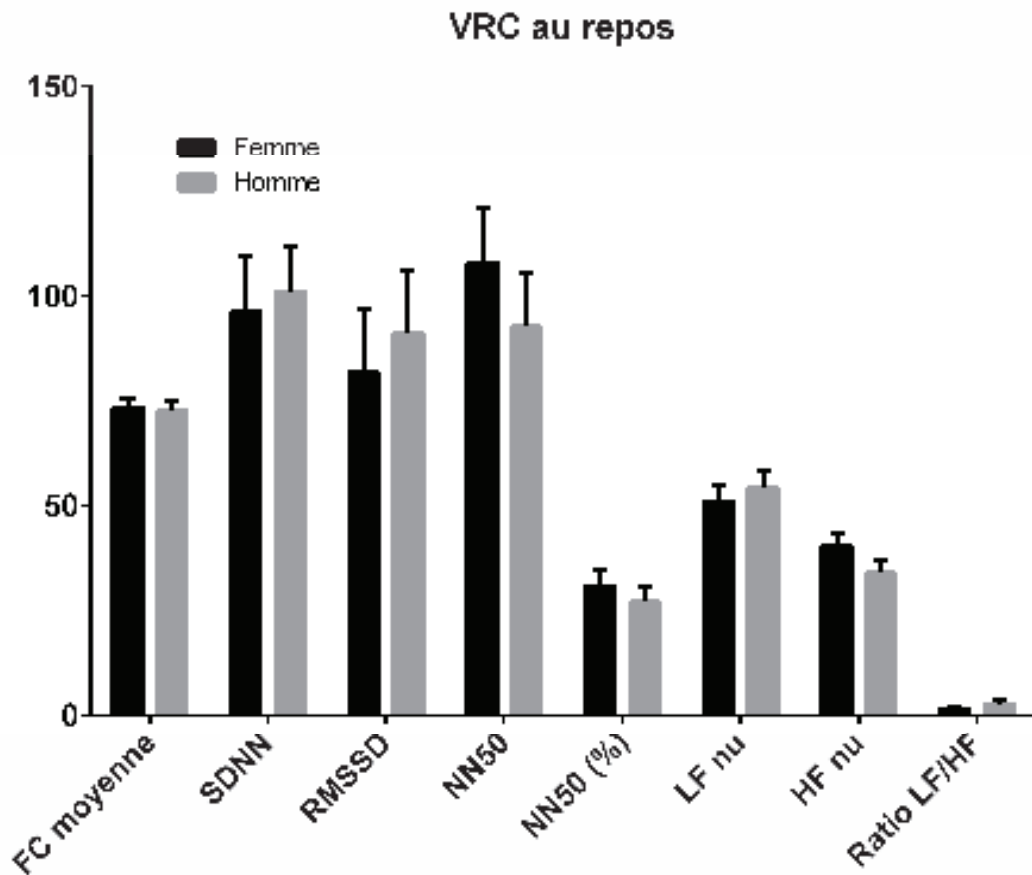


Figure 23. Comparaison l'activité du système nerveux autonome au repos chez les hommes et les femmes

Histogrammes comparant l'activité du SNA des hommes (bandes claires) et des femmes (bandes foncées) au repos. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur-type. Les comparaisons sont faites en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney. Aucune différence significative n'est observée..

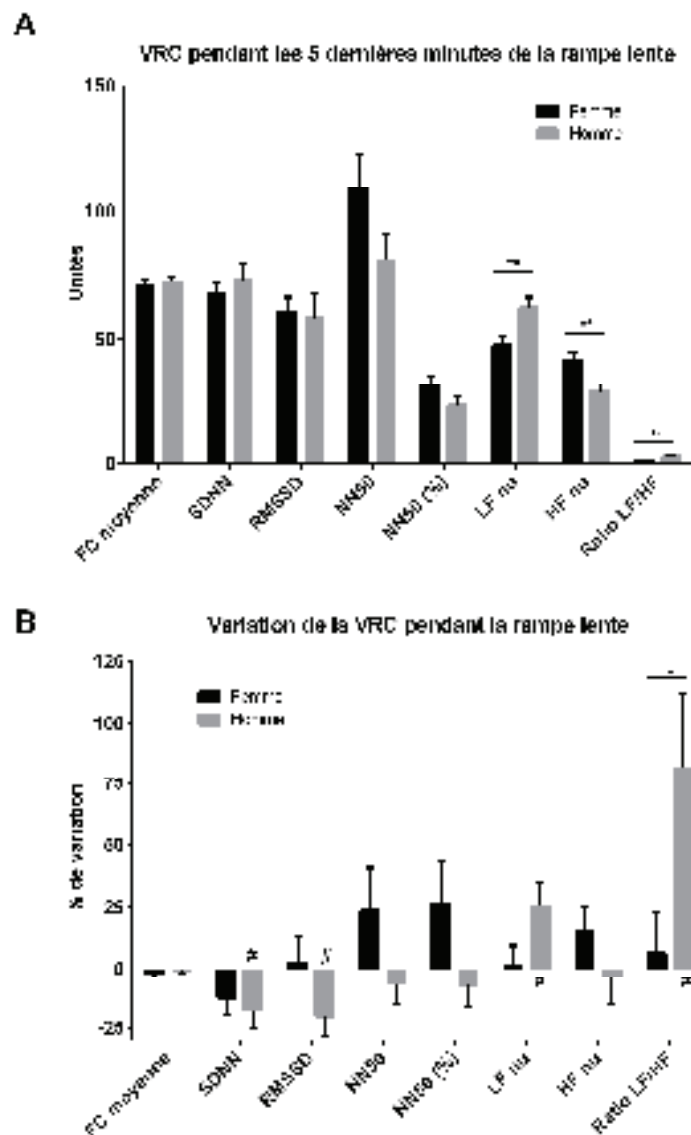


Figure 24. Comparaison de la réactivité du système nerveux autonome chez les hommes et les femmes en situation nociceptive

Histogrammes comparant la réactivité du SNA des hommes (bandes claires) et des femmes (bandes foncées). A) variabilité cardiaque pendant les 5 dernières minutes de la rampe lente; B) variation en pourcentage de la variabilité cardiaque lors des 5 dernières minutes de la rampe lente. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur-type. Les comparaisons sont faites en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$. Un test t de Student a été effectué afin de tester l'égalité des moyennes par rapport à une valeur donnée (valeur hypothétique = 0). #: $p < 0,05$.

4.2.4 Différence de réactivité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

La libération de cortisol a été comparée chez les hommes et les femmes, avant et après chacune des stimulations nociceptives en utilisant des tests de Mann-Whitney (test de Shapiro-Wilk, $p < 0.05$). Aucune différence n'est observable à aucun moment entre les hommes et les femmes (Figure 25). L'analyse de la variation du cortisol suivant la rampe rapide et la rampe lente montre que seul les hommes ont une variation significative (statistiquement différente de 0) lors de la rampe lente ($p = 0,0022$). Les analyses appariées de variation de cortisol salivaire vont dans le même sens; c'est-à-dire que seul les hommes ont une diminution significative du cortisol pendant la rampe lente (Rampe rapide, $p > 0,05$; Rampe lente, moyenne \pm écart-type; hommes: Avant $2,021 \pm 1,406$ nM vs Après $1,703 \pm 1,29$ nM, Z:-2,240, $p = 0,025$; femmes: Avant $1,412 \pm 0,789$ nM vs Après $1,867 \pm 2,81$ nM, Z:-1,831, $p = 0,067$).

4.2.5 Différence de microcirculation entre les hommes et les femmes

La microcirculation de la peau a été comparée chez les hommes et les femmes, avant et après chacune des stimulations nociceptives en utilisant des tests de Mann-Whitney (Shapiro-Wilk, $p < 0,05$). Une augmentation de la microcirculation plus importante est observée chez l'homme lors de la rampe rapide et de la rampe lente (Figure 26A). Lorsque l'on compare la variation de microcirculation en pourcentage, cette différence est toujours présente (Figure 26B). Cependant, lorsque l'on fait une analyse de covariance en fonction du temps de tolérance, que ce soit lors de la rampe rapide ou lors de la rampe lente, les résultats ne sont plus significatifs (ANCOVA, Rampe rapide: $F = 0,464$, $p = 0,501$, η^2 partiel = 0,015; Rampe lente: $F = 0,575$, $p = 0,454$, η^2 partiel = 0,017). Cela signifie que cette augmentation de la microcirculation chez l'homme est uniquement due au fait qu'il tolère la chaleur plus longtemps que la femme.

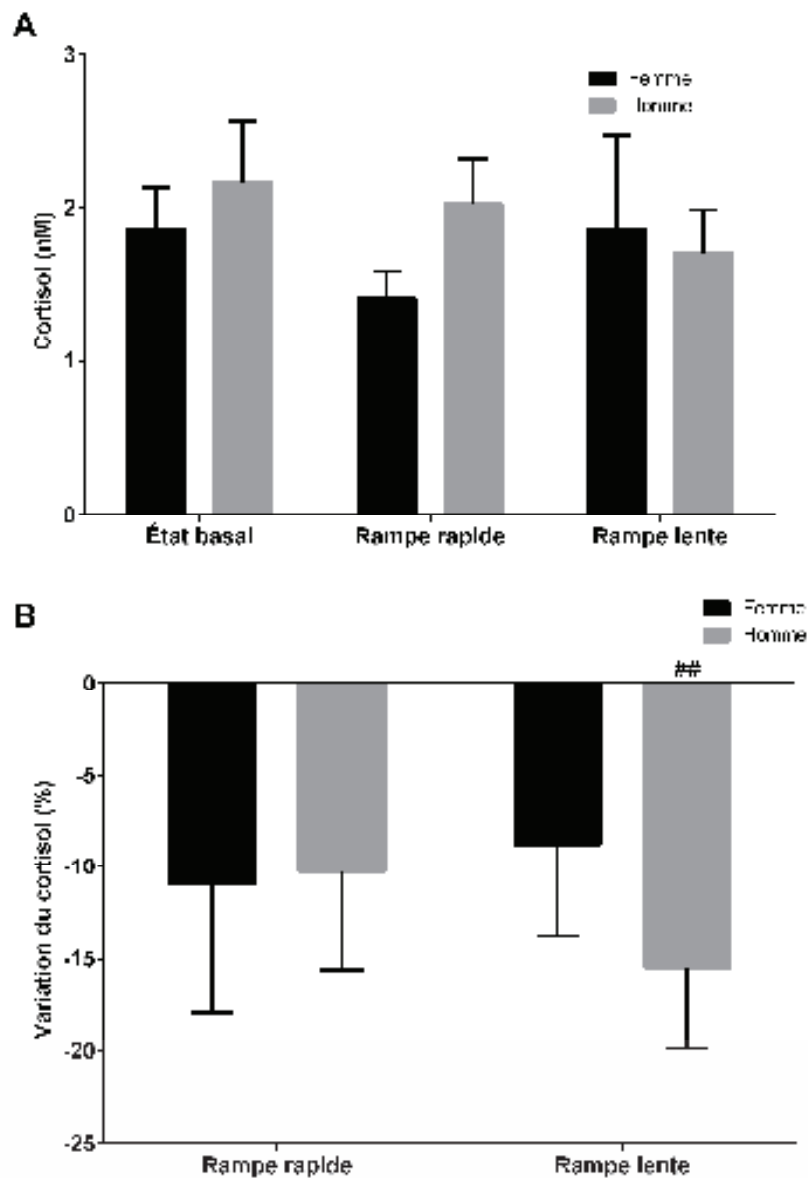


Figure 25. Réactivité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

Histogrammes comparant la réactivité de l'axe HHS des hommes (bandes claires) et des femmes (bandes foncées). A) Valeurs de cortisol salivair à l'état basal, après la rampe rapide et la rampe lente; B) Variation en pourcentage des valeurs de cortisol salivair après la rampe rapide et la rampe lente. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur-type. Les comparaisons sont faites en utilisant le test de Mann-Whitney. Aucune différence statistiquement significative n'est observée. Un test *t* de Student a été effectué afin de tester l'égalité des moyennes par rapport à une valeur donnée (valeur hypothétique = 0). ##: $p < 0,01$.

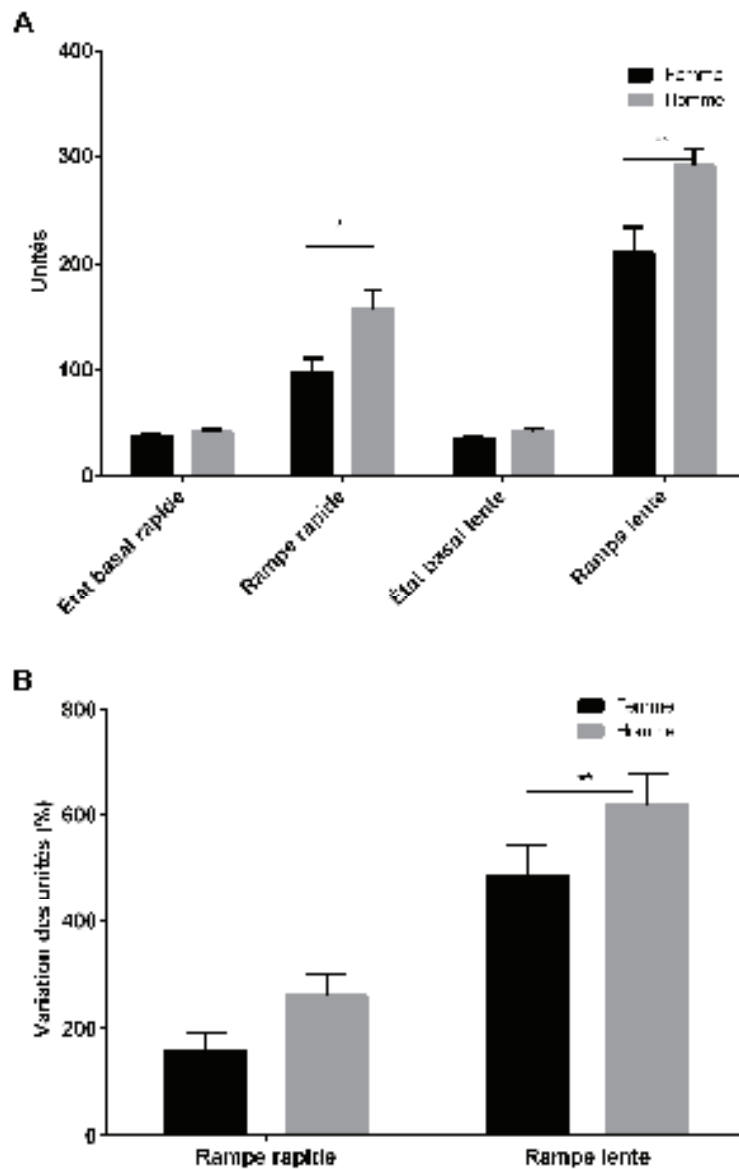


Figure 26. Différence de microcirculation entre les hommes et les femmes

Histogrammes comparant la microcirculation de la peau des hommes (bandes claires) et des femmes (bandes foncées). A) Microcirculation de la peau à l'état basal, après la rampe rapide et la rampe lente; B) variation en pourcentage de la microcirculation de la peau après la rampe rapide et la rampe lente. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur-type. Les comparaisons sont faites en utilisant le test de Mann-Whitney. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$. Toutes les variations de microcirculation sont significativement différentes de 0, $p < 0,0001$.

4.3 Facteurs influençant la perception de la douleur chez l'humain

4.3.1 Facteurs influençant la douleur: étude de la personnalité, de l'état émotionnel et du genre

Des corrélations non paramétriques de Spearman ont été utilisées afin d'étudier les facteurs influençant la douleur chez tous les participants de l'étude. Ici, aucune distinction entre les hommes et les femmes n'a été faite. Les résultats montrent que plusieurs facteurs sont en étroite relation avec la douleur lors des deux tests de thermode. Certains éléments ressortent, notamment la peur du danger, l'anxiété situationnelle et plusieurs composantes représentant le genre (Tableau 8).

4.3.2 Facteurs influençant la douleur: étude de l'état émotionnel situationnel et de la gestion active de la douleur

L'état émotionnel pendant la stimulation nociceptive (rampe lente) a été évalué par des corrélations de Spearman. Les résultats montrent que l'anxiété vécue pendant la stimulation influence particulièrement l'aspect désagréable de la douleur tandis que les stratégies de gestion active de la douleur telles que l'ignorance influencent davantage la tolérance à la douleur de même que le maximum atteint (Tableau 9).

4.3.4 Facteurs influençant la douleur: étude des paramètres physiologiques

Aucune corrélation n'était statistiquement significative entre le cortisol ou les variations de cortisol et la perception de la douleur (corrélations de Spearman, $p > 0,05$). Aucune corrélation n'était présente entre la microcirculation de la peau à l'état de base et la perception de la douleur (corrélations de Spearman, $p > 0,05$). Des corrélations significatives étaient présentes entre la mesure de flot sanguin après les stimulations nociceptives (rapide et lente) et la tolérance à la douleur (variation de la mesure de doppler après la rampe rapide en pourcentage et la tolérance à la douleur : Spearman $r = 0,561$, $p < 0,001$; variation de la mesure de doppler après la rampe lente en pourcentage et la tolérance à la douleur: Spearman $r = 0,707$, $p < 0,001$).

Des corrélations significatives ont été observées entre la variabilité cardiaque et la perception de la douleur (Tableau 10). La variabilité cardiaque, mesurée par les hautes fréquences (indicateur de l'activité parasympathique), les basses fréquences (indicateur de l'activité sympathique), et le ratio LF/HF (indicateur de la balance autonome), semble être en lien direct avec la perception de la douleur, particulièrement la tolérance à la douleur et le maximum atteint au cours de la rampe lente. Ces paramètres semblent aussi tendre à corrélérer avec le seuil de douleur. Cependant, la force de ces corrélations est moindre (LF : Spearman $r = 0,270$, $p = 0,088$; HF : Spearman $r = -0,333$, $p = 0,033$; Ratio LF/HF : Spearman $r = 0,305$, $p = 0,052$).

	Rampe rapide				Rampe lente			
	Seuil	Tolérance	Aspect désagréable	Maximum atteint	Seuil	Tolérance	Aspect désagréable	Maximum atteint
Personnalité								
Recherche de nouveauté	-,017	,057	-,089	-,167	,027	-,106	-,172	-,026
Évitement du danger	-,306	-,425**	-,056	,182	-,248	-,158	,225	,303
Dépendance à la récompense	-,248	-,236	-,240	-,046	-,141	-,223	-,116	,165
Persistance	-,001	,049	,184	,116	-,198	,081	,077	,092
Autodétermination	,029	-,057	,008	,113	-,062	-,185	,084	,161
Coopération	,139	,168	-,013	-,243	,082	-,009	-,188	-,028
Transcendance	-,017	,057	-,089	-,167	,027	-,106	-,172	-,026
État émotionnel								
Contrôle de soi	,235	,067	-,196	-,032	-,006	-,227	-,153	,164
Anxiété situationnelle	-,336*	,056	,323*	,033	-,171	,049	,168	,063
Trait d'anxiété	-,046	,164	,273	-,101	,196	,213	,072	-,135
ÉVA anxiété	-,259	-,009	,195	-,048	,034	-,008	-,004	-,030
Dépression	-,006	,037	-,051	-,026	-,001	,086	-,094	-,054
Catastrophisation	-,435**	-,108	,197	,098	-,212	-,049	,179	,065
Genre								
Score de masculinité	,342*	,385*	-,079	-,110	,222	,134	-,349*	-,306*
Score de féminité	-,200	-,403**	,117	-,079	-,336*	-,222	,096	,238
Score globale	,389*	,520**	-,076	-,008	,438**	,311*	-,261	-,414**
Autocotation masculinité	,446**	,665**	,247	-,313*	,418**	,517**	-,211	-,552**
Autocotation féminité	-,405**	-,596**	-,206	,100	-,407**	-,501**	,049	,445**
Haute estime	,080	-,025	-,136	-,195	-,187	-,065	-,267	-,002
Basse estime	,144	,076	,019	-,202	,111	,204	-,020	-,222

Tableau 8. Facteurs influençant la douleur

Tableau représentant les corrélations de Spearman entre les états psychologiques et la perception de la douleur lors de la rampe rapide et de la rampe lente. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$.

	Seuil	Tolérance	Aspect désagréable	Maximum atteint
<i>Perception qualitative de la douleur</i>				
Index de douleur	-,077	,080	,081	,015
Sphère sensorielle	-,121	,076	,004	-,034
Sphère affective	,174	,084	,027	,082
Sphère évaluative	-,006	,006	,251	,044
Autre sphère	,054	,156	,073	-,064
<i>Utilisation active de stratégies de gestion de la douleur</i>				
Distraction	-,001	-,180	,183	,302
Dramatisation	-,274	-,108	,173	,071
Réinterprétation	-,017	,117	-,063	-,096
Ignorance	,089	,305*	-,197	-,346*
Prière	-,025	-,126	,141	,187
Total	-,026	,013	,018	,016
<i>Gestion émotionnelle situationnelle</i>				
Anxiété	-,199	-,102	,459**	,205
ÉVA anxiété	-,135	-,014	,450**	,245
Catastrophisation	-,034	,006	,211	,069

Tableau 9. Perception de la douleur et gestion active de celle-ci

Tableau représentant les corrélations de Spearman entre les états psychologiques pendant la stimulation nociceptive et la perception de la douleur lors de la rampe lente. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

	Rampe rapide				Rampe lente			
	Seuil	Tolérance	Aspect désagréable	Maximum atteint	Seuil	Tolérance	Aspect désagréable	Maximum atteint
<i>Variabilité cardiaque à l'état basal</i>								
FC moyenne (bpm)	-,020	-,229	,036	,094	-,140	-,088	,198	,152
LF (nu)	-,180	,078	,149	-,063	-,066	,153	-,054	-,206
HF (nu)	-,011	-,187	-,159	,122	-,119	-,281	-,018	,297^T
Ratio LF/HF	-,072	,146	,131	-,133	,029	,201	-,077	-,245
<i>Delta variation pendant les 5 dernières minutes de la rampe lente</i>								
FC moyenne (bpm)		N/A			,006	,008	,109	,016
LF (nu)		N/A			,270	,356*	-,269	-,518*
HF (nu)		N/A			-,333*	-,378*	,252	,549***
Ratio LF/HF		N/A			,305^T	,375*	-,288	-,538***

Tableau 10. Influence de la variabilité cardiaque sur la perception de la douleur

Tableau représentant les corrélations de Spearman entre la variabilité cardiaque et la perception de la douleur lors de la rampe rapide et de la rampe lente. FC: fréquence cardiaque; LF: Basse fréquence en unité normalisée; HF: Haute fréquence en unité normalisée. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ^T: valeur de p entre 0,050 et 0,065.

4.4 Interrelation entre le sexe et les facteurs psychologiques influençant la douleur

4.4.1 Implication concrète du sexe

Afin de comprendre l'implication concrète du sexe sur la réponse nociceptive, nous avons covarié la différence de perception douloureuse entre les hommes et les femmes aux différents paramètres psychologiques observés, c'est-à-dire le tempérament d'évitement du danger, de l'anxiété situationnelle, la « catastrophisation » et le genre (score de masculinité, féminité et score global). Le tableau 11 montre que, même en excluant la variabilité produite par ces facteurs psychologiques, la différence entre les sexes demeure présente.

Lors de l'analyse de l'implication du sexe dans la perception de la douleur produite par la rampe lente, nous avons ajouté aux covariables les stratégies de gestion de la douleur par l'utilisation active de l'ignorance et la dramatisation. Le tableau 12 montre que, malgré ces facteurs, la tolérance à la douleur et le maximum atteint pendant le test demeurent très significatifs entre les deux sexes.

	Valeur observée		Valeur estimée		F	p	η^2 partiel	R ²
	Moyenne \pm écart-type		Moyenne \pm erreur-type					
	Femme	Homme	Femme	Homme				
Seuil (°C)	42,07 \pm 1,97	43,93 \pm 1,52	42,96 \pm 0,41	43,90 \pm 0,43	7,206	0,011	0,175	0,433
Tolérance (°C)	46,11 \pm 1,22	48,96 \pm 1,22	46,07 \pm 0,30	49,00 \pm 0,30	36,462	<0,001	0,51	0,668
Aspect désagréable (%)	30,71 \pm 22,38	47,00 \pm 26,88	28,48 \pm 6,11	49,23 \pm 6,11	4,495	0,041	0,114	0,280
Maximum atteint (%)	100,00 \pm 0,00	94,19 \pm 13,57	101,36 \pm 2,583	92,83 \pm 2,58	4,245	0,047	0,108	0,131

Tableau 11. Covariation de la perception de la douleur lors de la rampe rapide

Ce tableau représente l'ANCOVA de la perception de la douleur lors de la rampe rapide covariée pour le tempérament d'évitement de la punition, de l'anxiété situationnelle, de la catastrophisation et du genre. Les valeurs observées sont les données réelles mesurées au laboratoire alors que les valeurs estimées représentent les valeurs pondérées pour les différentes covariables.

	Valeur observée		Valeur estimée		F	p	η^2 partiel	R ²
	Moyenne \pm écart-type		Moyenne \pm erreur-type					
	Femme	Homme	Femme	Homme				
Seuil (min)	6,30 \pm 1,18	7,09 \pm 1,19	6,42 \pm 0,32	6,96 \pm 0,32	1,058	0,311	0,031	0,234
Tolérance (min)	10,06 \pm 2,71	12,84 \pm 1,33	9,94 \pm 0,56	12,97 \pm 0,56	10,831	0,002	0,247	0,442
Aspect désagréable (%)	41,90 \pm 28,35	34,31 \pm 28,53	36,83 \pm 7,68	39,38 \pm 7,68	0,041	0,840	0,001	0,173
Maximum atteint (%)	92,14 \pm 19,38	64,29 \pm 29,52	93,19 \pm 6,86	62,52 \pm 6,86	7,870	0,008	0,193	0,344

Tableau 12. Covariation de la perception de la douleur lors de la rampe lente

Ce tableau représente l'ANCOVA de la perception de la douleur lors de la rampe lente covariée pour le tempérament d'évitement de la punition, de l'anxiété situationnelle, de la catastrophisation, du genre, les stratégies de gestions de la douleur utilisant l'ignorance et la dramatisation. Les valeurs observées sont les données réelles mesurées au laboratoire alors que les valeurs estimées représentent les valeurs pondérées pour les différentes covariables.

4.4.2 Facteurs impliqués dans la douleur indépendamment du sexe

Des différents facteurs impliqués dans la perception de la douleur, plusieurs d'entre eux varient en fonction du sexe (test t de Student). On note particulièrement le tempérament d'évitement du danger ($t = 3,822$, $p < 0,001$), le score de masculinité ($t = -2,293$, $p = 0,027$), le score global du genre ($t = -2,778$, $p = 0,008$) et la stratégie de gestion de la douleur impliquant l'ignorance ($t = -2,761$, $p = 0,009$). Certains paramètres ne sont pas différents entre les hommes et les femmes : l'inventaire d'anxiété situationnel, la « catastrophisation », le score de féminité et l'anxiété pendant la stimulation nociceptive ($p > 0,05$).

Nous avons voulu savoir si le fait que ces facteurs soient impliqués dans la douleur était associé directement au sexe. L'utilisation de régression linéaire hiérarchique en terme théorique permet « de déterminer l'ordre d'entrée des variables dans le modèle à l'aide de création de blocs de variables qui seront entrés de manière hiérarchisée dans le modèle » (Yergeau et Poirier, 2013). Dans notre situation, l'utilisation de régression linéaire hiérarchique permet de calculer la contribution ajoutée d'un facteur. Ce processus calcule le R^2 associé au sexe, puis le R^2 associé au sexe et au facteur évalué. Ensuite, la variation du R^2 est mesurée afin de définir quelle partie est associée au facteur évalué en tant que tel. Une ANOVA permet d'évaluer la signification de ce changement. Le tableau 13 présente les différences de R^2 associées aux différents facteurs psychologiques impliqués dans la douleur. Les résultats montrent que l'anxiété et de façon moindre la « catastrophisation », indépendamment du sexe, explique 7,8% et 7,0% de la variabilité du seuil de douleur de la rampe rapide, respectivement. Le score de masculinité, indépendamment du sexe, explique 10,3% de l'aspect désagréable de la rampe lente. Le score de féminité, indépendamment du sexe, explique 4,1% de la tolérance à la douleur lors de la rampe rapide et 9,1% du seuil de douleur lors de la rampe lente. Le score global du genre, indépendamment du sexe, explique 4,9% de la tolérance à la douleur lors de la rampe rapide, et de façon tendancielle 8% de la variation de l'aspect désagréable de la douleur lors de la rampe rapide. Finalement, l'anxiété vécue pendant la douleur, indépendamment du

sexe, est associée à 17% de l'aspect désagréable de la douleur pendant la rampe lente, et 7,3% du maximum atteint pendant la rampe lente.

L'implication de la VRC sur la douleur perçue pendant la rampe lente a aussi été mise en relation. Il semblerait que la variabilité cardiaque en lien avec la tolérance à la douleur serait dépendante du sexe, mais pas le maximum atteint pendant la stimulation lente. Cela signifie qu'indépendamment du sexe, la VRC est impliquée dans la modulation de la douleur. Cette implication est toujours valide même si l'on considère le temps total de la stimulation, donc indépendamment du sexe et du temps total de la stimulation, la variabilité cardiaque influence significativement le maximum atteint lors de la rampe lente (LF nu : Variation du $R^2 = 0,063$, $p = 0,057$; HF nu : variation du $R^2 = 0,082$, $p = 0,024$; Ratio LF/HF : Variation du $R^2 = 0,137$, $p = 0,003$).

	Rampe rapide				Rampe lente			
	Seuil	Tolérance	Aspect désagréable	Maximum atteint	Seuil	Tolérance	Aspect désagréable	Maximum atteint
Personnalité								
Évitement du danger	,002	,001	,018	,003	,001	,023	,047	,007
État émotionnel								
Anxiété situationnelle	,078*	,007	,058	,026	,002	,003	,019	,059
Catastrophisation	,070^T	,005	,043	,000	,010	,005	,014	,000
Genre								
Score de masculinité	,044	,014	,058	,005	,002	,004	,103*	,018
Score de féminité	,012	,041*	,031	,000	,091*	,005	,002	,005
Score global	,049	,049*	,080^T	,003	,058	,000	,056	,019
Utilisation active de stratégies de gestion de la douleur								
Ignorance			N/A		,009	,009	,014	,010
Gestion émotionnelle situationnelle								
Anxiété			N/A		,019	,015	,170***	,073*
Variabilité cardiaque en situation douloureuse								
LF (nu)			N/A		,000	,016	,046	,090*
HF (nu)			N/A		,002	,007	,021	,102*
Ratio LF/HF			N/A		,003	,010	,077	,167**

Tableau 13. Facteurs psychologiques impliqués dans la douleur indépendamment du sexe

Tableau représentant les corrélations associées au régression linéaire hiérarchique mettant au premier niveau le sexe et au second niveau les différents facteurs psychologiques impliqués dans la douleur. Le tableau représente les différences de R^2 calculé entre le premier et le second niveau. * : $p < 0,05$; *** : $p < 0,001$; ^T: valeur de p comprise entre 0,051 et 0,065.

5. Discussion

Au cours de ce projet, nous avons étudié les différents facteurs impliqués dans la différence de perception de la douleur chez les hommes et les femmes. Nos résultats ont démontré une différence indéniable de la réponse à la douleur chez les participants hommes et femmes observés au laboratoire. Un seuil de douleur plus faible et une tolérance moins grande ont été observés chez les femmes en comparaison des hommes, tant pendant la stimulation rapide que la stimulation lente. Plusieurs facteurs sont impliqués dans la perception de la douleur, que ce soit des traits de personnalité, de l'humeur, des stratégies de gestion de la douleur, ou des facteurs physiologiques comme la variabilité du rythme cardiaque. Ce sont des facteurs impliqués d'une part dans la modulation de la douleur, mais aussi, des facteurs qui sont exprimés différemment chez les hommes et chez les femmes. Finalement, nous avons pu conclure par cette étude que le sexe, bien que plusieurs facteurs viennent l'influencer par la suite, est incontestablement un facteur extrêmement important dans la réponse à la douleur. Cependant, plusieurs facteurs semblent apporter une modulation propre et particulière indépendamment du sexe.

La première hypothèse de ce projet de recherche était l'implication de la personnalité dans la perception de la douleur. Ce facteur est souvent oublié dans les recherches sur la douleur et il définit de façon importante la façon d'être et d'agir des personnes. La relation entre la perception de la douleur et la personnalité se fait particulièrement par le tempérament d'évitement du danger. Ce tempérament regroupe plusieurs sous-catégories, entre autres, la timidité, l'anxiété d'anticipation, la peur de l'incertitude et la fatigabilité/asthénie (Cloninger *et al.*, 1993). Dans notre cas, le tempérament d'évitement du danger est très bien corrélé à la dépression (Pearson $r = 0,412$, $p < 0,001$). La relation entre la perception de la douleur et l'évitement du danger avait déjà été présenté quelques fois dans le passé. En effet, Dixon et ses collaborateurs (2004) avaient observé une différence de perception de la douleur entre les hommes et les femmes lors d'un bain d'eau froide à 4°C. Ils avaient pu corréliser l'intensité de cette douleur et son aspect désagréable avec la vulnérabilité émotionnelle de ces sujets (Dixon *et al.*, 2004).

Ce résultat est fortement compatible avec ceux observés lors de notre étude. Bien que leur vulnérabilité émotionnelle ait été évaluée par un test de personnalité différent, celui-ci s'apparente fortement à la notion d'évitement du danger de l'ICT de Cloninger utilisé dans notre projet de recherche. Tout comme eux, cet aspect de la personnalité est différent entre les hommes et les femmes. Cependant, un point d'analyse important, qui apporte une force à notre étude, est la régression linéaire hiérarchique que nous avons faite. Cette analyse a permis de définir cette variable davantage comme un confondant plutôt qu'une cause réelle. En effet, si l'on retire la variable du genre de la corrélation par une analyse de régression linéaire hiérarchique, cette variable n'est plus significative. Par contre, si l'on retire la composante d'évitement du danger par cette même procédure, le sexe est toujours corrélé à la perception de la douleur.

Un second paramètre important dans la considération des différents facteurs psychologiques est l'évaluation de l'anxiété et de la « catastrophisation ». Ces deux concepts sont différents, mais chez les sujets sains (sans douleur ni pathologie psychiatrique), ils sont tout de même assez proches. L'anxiété a été définie comme étant un état psychologique distinct qui s'oriente et se définit davantage par rapport à l'anticipation du futur, alors que la « catastrophisation » est une exagération et une surévaluation de la situation menaçante et une sous-estimation des ressources disponibles pour la contrer. Il est étonnant de voir que ces deux facteurs influencent le seuil de douleur uniquement lors de la rampe rapide. Comme son nom l'indique, cette rampe dynamique produit une augmentation de température qui se fait rapidement et que les personnes n'anticipent pas aussi longtemps que pendant la rampe lente. Bien que les sujets aient effectué plusieurs prétests utilisant cette même rampe, il est possible de suggérer que l'anxiété d'anticipation est davantage présente lors de cette stimulation qui augmente rapidement puisqu'elle laisse moins de temps à l'adaptation. Aussi, l'anxiété, tant celle à l'arrivée au laboratoire que celle vécue pendant la stimulation lente, est particulièrement associée à l'aspect désagréable de la douleur. Ces éléments n'étaient pas différents entre les deux groupes et les

régressions linéaires hiérarchiques ont confirmé que ces éléments étaient impliqués indépendamment du sexe.

Nos résultats démontrent une attente quant au rôle du genre dans la douleur qui n'est pas différente entre les hommes et les femmes, mais qui rejoint les concepts connus de la douleur. Entre autres, autant les hommes que les femmes mentionnent que les femmes sont plus ouvertes à verbaliser leur douleur. Ce phénomène n'est pas surprenant considérant que la sociabilité des hommes et des femmes est différente et que celle-ci se met en place en très bas âge (Fearon *et al.*, 1996; Keefe *et al.*, 2000). Il est connu que le genre, tel que mesuré par l'inventaire du rôle du sexe de Bem (BSRI), influence la perception de la douleur. Les personnes ayant un score de masculinité plus élevé sont connues comme présentant un seuil de douleur et une tolérance à la douleur plus élevés que les gens moins masculins (Otto et Dougher, 1985). Le BSRI est grandement critiqué depuis le début des années 2000 (Fernandez et Coello, 2010). On mentionne que le genre n'est plus un sujet d'actualité et que la société est passée à autre chose. Cependant, très peu de tests d'évaluation du genre sont disponibles. Il existe le PAQ (*Personality attributes Questionnaires*), qui est autant critiqué que le BSRI. Les autres alternatives sont souvent associées à l'utilisation de tests de personnalité. Nous avons nous-mêmes constaté les fortes corrélations entre le genre et les différents tempéraments et caractères de l'ICT de Cloninger. Dans ce document, nous avons séparé le genre en un score de masculinité, un score de féminité, un score global, l'autocotation de la féminité, l'autocotation de la masculinité. Nous avons aussi utilisé certains scores références tels que ceux de l'estime de soi. Les corrélations entre les différents scores de masculinité et de féminité sont particulièrement grandes. Cela a soulevé plusieurs questions à savoir si le genre était prédominant sur le sexe. Les analyses de régression hiérarchique ont démontré que le genre n'était en fait qu'un facteur dérivé du sexe et qu'il n'avait aucune puissance réelle sur la modulation de la douleur.

Un autre élément important est l'utilisation préférentielle de stratégies de gestion de la douleur impliquant l'ignorance chez les hommes en comparaison des

femmes. Cette différence dans la gestion de la douleur est en accord avec d'autres études (Ramirez-Maestre *et al.*, 2004), et tout comme l'a suggéré cette équipe l'utilisation de stratégies actives comme l'ignorance est associée directement aux traits de personnalité, notamment l'évitement du danger (Pearson $r = -,489$, $p = 0,001$) et à la dépendance à la récompense (Pearson $r = -,386$, $p = 0,012$). L'étude corrélacionnelle de ce facteur dans la perception de la douleur a montré un lien important sur la tolérance à la douleur lors de la stimulation lente et le maximum atteint lors de cette même stimulation. Les régressions linéaires hiérarchiques ont cependant montré que ce facteur est intrinsèquement lié au sexe.

L'évaluation de la libération de cortisol salivaire lors de stress et de douleur est relativement commune. L'utilisation du dosage de cortisol salivaire est de plus en plus utilisée en recherche puisqu'il représente le cortisol libre, c'est-à-dire celui qui est biologiquement actif dans le corps (Vining *et al.*, 1983). Dans le cas de l'étude de Dixon et collaborateur, ces derniers avaient observé une différence du cortisol salivaire après le bain d'eau froide. De plus, ils ont aussi mesuré une corrélation entre les niveaux de cortisol après le bain et la tolérance à celui-ci. Les résultats que nous avons observés ont montré une variation du cortisol salivaire intra-sujets. Cependant, ces variations ne sont pas aussi importantes que dans l'étude de Dixon et collaborateurs (ni en terme de direction, ni d'amplitude), et ces variations ne corrélaient en aucun cas avec la perception de la douleur. Plusieurs facteurs peuvent expliquer les résultats obtenus. D'une part, leur échantillon est beaucoup plus grand que le nôtre. En effet, ils ont recruté 112 femmes et 91 hommes pour cette étude. De plus, leur stimulation nociceptive était particulièrement importante (bain d'eau froide entre 0 et 2°C pendant un maximum de 5 minutes). Il est possible que les stimulations nociceptives utilisées au laboratoire ne soient pas un stress suffisant pour libérer le cortisol selon un modèle typique (Kirschbaum et Hellhammer, 1994). Finalement, leurs prélèvements salivaires étaient faits 15 minutes suivant la fin de la stimulation nociceptive, alors que notre prélèvement était fait pendant les 5 minutes suivant la fin de la stimulation douloureuse. Bien que nous n'ayons pas observé de relation entre le cortisol salivaire et le tempérament de recherche de nouveauté (Pearson

$r = -,281, p = 0,071$), cette relation a été observée par une autre équipe utilisant le cortisol plasmatique (Tyrka *et al.*, 2006). Il est à noter que leur étude évaluait le cortisol plasmatique à 15h00. Dans notre cas, il s'agissait de cortisol salivaire, prélevé pendant une fenêtre de temps allant de 12h00 à 20h00, ce qui peut avoir influencé la variabilité des données.

Des mesures de l'activité du système nerveux autonome ont aussi été effectuées. Bien que les mesures de températures de la peau et de la microcirculation n'aient pas été différentes entre les hommes et les femmes, certaines différences dans l'analyse de la variabilité cardiaque ont été observées. Dans un premier temps, aucune différence de VRC n'a été observée à l'état basal. Ce résultat est conséquent avec ceux observés par Tousignant-Laflamme en 2005. Cependant, plusieurs autres équipes utilisant de plus grands échantillons ont mesuré une différence de la VRC entre les hommes et les femmes, notamment une valeur de LF et un ratio LF/HF plus élevés chez les hommes (Liao *et al.*, 1995; Ramaekers *et al.*, 1998; Saleem *et al.*, 2012). Nos résultats montrent cependant une différence de la VRC entre les hommes et les femmes en situation douloureuse. Les hommes présentent une activation sympathique (variabilité LF) plus grande et une activité parasympathique (variabilité HF) plus faible que celle des femmes. En d'autres termes, on pourrait dire que les hommes sont davantage prêts à combattre ou à fuir en comparaison des femmes. Cependant, contrairement à l'étude précédente faite au laboratoire (Tousignant-Laflamme *et al.*, 2005), une différence de la fréquence cardiaque n'a pas été observée entre les groupes. Certaines différences méthodologiques pourraient expliquer que Tousignant-Laflamme et ses collaborateurs observent une variation de la fréquence cardiaque et pas de la VRC et nous l'inverse. Un point important est la modalité de la stimulation qui était différente. En effet, la stimulation nociceptive de leur étude était l'immersion de la main dans un bain d'eau chaude à 47°C pendant 2 minutes. Cette équipe mentionne elle-même qu'une stimulation de 2 minutes est une période relativement courte pour évaluer la variabilité cardiaque. De plus, leurs participants rapportent une douleur moyenne en fin de test autour de 50/100 alors que nos participants rapportent une douleur plutôt entre 70 et 100% en fin de test.

Enfin, nous avons pu déterminer que l'implication de la variabilité cardiaque sur la perception de la douleur n'est pas entièrement liée au sexe. En effet, indépendamment du sexe ou de la durée de la stimulation, la variabilité cardiaque en situation douloureuse influence la douleur perçue lors de la rampe lente.

Les résultats de cette étude, comme plusieurs autres auparavant, ont montré une différence importante de perception de la douleur entre les hommes et les femmes. Cette étude visait à évaluer concrètement le rôle des différents facteurs en lien avec la douleur. Nous avons observé que plusieurs facteurs influencent la douleur, dont des relations directes entre les facteurs psychologiques et la perception de la douleur. Malgré tous les facteurs psychologiques distinguant les hommes des femmes, le sexe demeure un élément prédominant de la différence de perception de la douleur. De plus, des résultats intéressants concernant la réactivité du SNA ont été observés chez les hommes et les femmes. Les relations entre la réactivité du SNA et la perception de la douleur seraient indépendantes du sexe du participant.

ARTICLE 1

Implication of androgens and adrenal hormones in pain perception and clinical symptoms of fibromyalgia

Auteurs de l'article: Marie-Andrée Coulombe, Stéphane Potvin, Mélanie Morin, Isabelle Gaumond, Serge Marchand

Statut de l'article: soumis à *Seminars in Arthritis and Rheumatism* le 15 mai 2013

Avant-propos: L'écriture de ce projet, qui était partie intégrante du protocole de recherche **07-132** (Quetiapine (Seroquel XR) for the treatment of fibromyalgia: a clinical and mechanistic pilot study), a été effectuée par Mélanie Morin et Stéphane Potvin. Les données psychophysiques ont été collectées par Mélanie Morin et une infirmière clinique à Sherbrooke et à Québec. Mon rôle dans ce projet a été le choix des analyses sanguines, la compilation d'une partie des données, l'analyse statistique et la rédaction de l'article scientifique en découlant.

Résumé : Cette étude avait pour objectif d'étudier la relation entre les fonctions neuroendocriniennes, le système nerveux autonome et la perception de la douleur chez des sujets sains (SS) et des sujets atteints de fibromyalgie (FM). Quarante (40) sujets FM et 23 SS ont été recrutés. La sévérité des symptômes cliniques des sujets FM a été mesurée par différents questionnaires évaluant l'impact de la fibromyalgie dans la vie des sujets, l'anxiété, la dépression, la qualité du sommeil et la qualité de vie de ces sujets. La douleur expérimentale a été évaluée au laboratoire chez les SS et FM. Des mesures de seuil de douleur et de tolérance ont été effectuées. Les contrôles inhibiteurs diffus nociceptifs (CIDN) ont été évalués à l'aide d'un stimulus conditionnant consistant en un bain d'eau froide à 12°C. Le cortisol, la testostérone, la DHEA et la DHEAS ont été dosés dans le sang. Par la suite, le ratio cortisol/DHEA et le ratio DHEAS/DHEA ont été calculés afin

d'évaluer la direction de l'activité enzymatique. La variabilité cardiaque par analyse spectrale a été effectuée afin d'évaluer la composante sympathique et parasympathique du système nerveux autonome. Les résultats ont montré une sensibilité à la douleur plus importante, de même qu'un CIDN inférieur chez les sujets FM. Une augmentation du cortisol plasmatique a aussi été observée chez les sujets FM, ainsi qu'un déséquilibre de l'activité sympathique et parasympathique basale. Des études corrélationnelles ont permis de montrer certains liens entre la neuroendocrinologie et la douleur. Les résultats observés suggèrent une implication des hormones gonadiques et adrénérgiques dans les symptômes cliniques et la perception de la douleur chez les sujets FM. La sévérité des symptômes cliniques semble, en partie, liée aux concentrations hormonales. Ces résultats corroborent les hypothèses formulées par d'autres équipes, suggérant une surcharge allostatique chez les sujets atteints de fibromyalgie.

Implication of androgens and adrenal hormones in pain perception and clinical symptoms of fibromyalgia

Marie-Andrée Coulombe, M.Sc¹; Stéphane Potvin, Ph.D^{1,2}; Mélanie Morin, Ph.D¹; Isabelle Gaumond, Ph.D¹; Serge Marchand, Ph.D¹

¹ Département de chirurgie, Service de neurochirurgie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

² Centre de recherche Fernand-Seguin, Département de psychiatrie, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Corresponding author

Serge Marchand, PhD; Université de Sherbrooke, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Axe Inflammation/Douleur Centre de recherche clinique Étienne-Le Bel du CHUS; 3001, 12^e avenue nord, Sherbrooke, Canada; J1H 5N4; (819) 346-1110, ext. 15889; Fax: (819) 564-5424; serge.marchand@usherbrooke.ca

Abstract

Fibromyalgia syndrome (FMS) is a chronic pain condition with a higher prevalence in women. Many factors could be involved in this pathology.

Objective: The aim of this study was to evaluate the influence of androgens and adrenal hormones on clinical pain symptoms and experimental pain perception.

Methods: Forty FMS patients and 23 healthy controls (HC) were recruited. Plasmatic cortisol, dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate (DHEAS) and testosterone were dosed and correlated with clinical symptoms (depression, anxiety, pain, sleep quality and quality of life) and experimental pain (thermal pain threshold, pain during cold pressor test (CPT) and inhibitory conditioned pain modulation (ICPM) induced by the CPT). Autonomic nervous system (ANS) was also analysed using heart rate variability spectral analysis. **Results:** Lower pain threshold and tolerance, and decreased ICPM were observed in FMS subjects. Higher cortisol levels and an alteration of the basal activity of ANS were measured in FMS patients. Furthermore, results showed that high DHEAS increased clinical symptoms associated with FMS (FIQ, pain score, anxiety, sleep disturbance). A positive correlation was also observed between DHEAS levels, DHEAS/DHEA ratio and pain rating during CPT in FMS. Also, a negative correlation between testosterone and pain rating during CPT was observed in FMS. **Conclusion:** These results show an important implication of adrenal and gonadal hormones in clinical and experimental pain perception. These results sustain the hypothesis of an allostatic load in FMS and bring new insight in the understanding of the pathophysiology of FMS.

Key words Pain; Fibromyalgia; Allostasis; Androgens; Cortisol; DHEAS; Heart Rate Variability.

Introduction

Sex differences in pain perception and analgesia are supported by both clinical and pre-clinical research (1, 2). These differences may be explained by multiple factors, including biological and sociocultural ones. Biological factors such as gonadal hormones and sexual dimorphisms of the central nervous system have been identified as potential factors contributing to the increased prevalence of some chronic pain conditions in women compared to men, such as fibromyalgia, temporomandibular joint disorder, migraine, osteoarthritis, irritable bowel syndrome and rheumatoid arthritis (1).

Fibromyalgia syndrome (FMS) is characterized by chronic widespread pain, muscle tenderness to palpation at anatomically defined tender points (presence of 11 out of 18), persisting fatigue, and sleep disturbances in absence of physiological causes (3, 4). FMS has a female-to-male ratio of 6:1, and this syndrome is observed in 1% of women between 18-29 years old and in about 7% of those aged between 70-79 years old (5). Given the higher prevalence of FMS in women compared to men, sex hormones are considered as potential factors involved in the pathophysiology of this syndrome. Androgens and their derived metabolites are well-known modulators of pain mechanisms; they can also modulate neurotransmission and neuronal activity (1, 6, 7). For a long time, it was believed that the sex steroids acted only through their binding to nuclear receptors. However, it is now well demonstrated that sex steroids and their metabolites also bind membrane receptors, such as gamma-amino-butyric acid (GABA)_A, N-methyl-D-aspartate (NMDA), glycine and serotonin receptors (8-11).

FMS is associated with hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) hyporeactivity, characterized by a loss of HPA axis resiliency (12, 13). Interestingly, cortisol and androgens are both synthesized, at least in part, by the adrenal glands and their synthesis seems to be auto-regulated by each other. Many groups tried to show a causal effect of circadian rhythm of cortisol on pain symptoms in FMS. It was first showed that circadian rhythm is different between FMS patients and healthy controls (13). However, only a small correlation was

observed between morning cortisol levels and waking pain symptoms (14). In fact, the loss of HPA axis resiliency is a clear sign of allostatic load, which means that the system processing the adaptation to stress is not working as it should be (15). Allostasis is a complex system involving neurotransmitters, neuropeptides, hormones, cytokines, the autonomic nervous system (ANS), and the HPA axis (16). Autonomic nervous system dysregulation has been observed in FMS patients (17). Many groups have observed hypersympathetic and hypoparasympathetic tone of the nervous system in FM (17, 18). There is a relationship between the ANS and adrenal secretion. Indeed, sympathetic activation is having a strong influence on cortisol secretion and the regulation of steroidogenic enzymes (19).

Few studies have explored the relationship between FMS and androgens. The studies on the neuroendocrinology of FMS are often limited to specific sex steroids and clinical symptoms. In fact, FIQ or pain scales were almost always used as the pain marker in other studies, without comparing clinical symptoms with experimental pain perception in FMS. This study aimed to evaluate the relationship between some elements involved in the FMS pathology and understand what might explain the clinical symptoms and the increased experimental pain perception in those patients. We sought to examine the relationship between endocrine function and pain perception in association with the ANS in FMS patients and healthy controls (HC). We measured androgens and adrenergic metabolites and correlated them with clinical symptoms, experimental pain perception and ANS measures. Moreover, we examined the molar ratio of these hormones in order to evaluate adrenal pathways and enzyme activity. For example, the ratio between dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfate ester (DHEAS) indicates the activity of the DHEA sulfotransferase (DHEAS/DHEA ratio), and the cortisol/DHEA ratio indicates the direction of the reaction of cortisol to adrenal androgens (20).

Methods

Participants

Forty patients suffering from FMS and 23 HC participated in this study. Patients were diagnosed with FMS using *American College of Rheumatology* criteria (4) by neurosurgeons, rheumatologists and physicians specialized in pain. Healthy controls did not suffer from any chronic pain condition. Participants (FMS patients and HC) who were pregnant or breastfeeding, who suffered from diabetes, lupus, rheumatoid arthritis or a cardiac pathology were excluded from the study. The Human Ethics Committees of the *Université de Sherbrooke* approved the research protocol, and all participants gave their written, informed consent. FMS patients and HC did not differ in terms of age [HC=50.8 ± 6.8 years; FMS =50.1 ± 10.5 years; $t = 0.321$; $p = 0.749$], and the presence or absence of a regular menstrual cycle [HC: 7 presence, 18 absence; FMS: 7 presence, 33 absence; $\chi^2 = 1.004$; $p = 0.316$]. FMS patients were treated with one or more of the following medications [opioids = 21 (52.5%); anxiolytics = 3 (7.5%); anticonvulsants = 18 (45%); antidepressants = 25 (62,5%); anti-inflammatory drugs = 26 (65%); benzodiazepine = 14 (35%); antipsychotic = 19 (47.5%)], and none were drug-free. HC were all drug-free.

Clinical assessment

The symptoms severity in FM was evaluated using the French version of the self-administered **Fibromyalgia Impact Questionnaire** (FIQ) that measures functional disabilities such as pain, stiffness, fatigue, anxiety, depression, physical functioning, work status, and well-being (21, 22). Depressive mood and anxiety disorders were assessed using the French version of the *Hamilton Depression Rating Scale* (HAM-D) and the *Hamilton Anxiety Rating Scale* (HAM-A) (23, 24). Sleep quality was measured with the French version of *Pittsburgh Sleep Quality Index* (PSQI) (25). The PSQI evaluates sleep difficulties, including subjective sleep quality, sleep latency, sleep duration, sleep efficiency, sleep disturbances, sedative medication use and daytime functioning. Finally, the quality of life was assessed using the French version of the short form of the *Quality of Life Enjoyment and Satisfaction Questionnaire* (Q-LES-Q- SF) (26).

All questionnaires have acceptable internal consistency and construct validity. The HAM-D and HAM-A were both administered by a trained nurse.

Pain measures

Thermal Pain Thresholds

Thermal pain thresholds (TPTs) and pain tolerance were measured during the pretest by applying a thermode on the left forearm of participants. The Peltier thermode used [TSA II, Medoc, Advanced medical systems, Minneapolis, MN 55435] consisted of a heating plate controlled by a computer. This allowed a precise setting of experimental temperature used during the 2-min stimulation described below. In this pretest, the thermode's temperature varied between 32°C and 50°C, increasing at a rate of 0.3°C per second. Subjects were instructed to verbally report when their sensations changed from heat to pain (TPT), and from TPT to pain tolerance. Between these two points, the pain was continuously measured during the full thermal stimulation. Pain intensity (from 0 - no pain to 100 - most intense pain tolerable) was measured using a computerized visual analog scale (COVAS). The pain threshold and the thermal pain tolerance shown in the results section were measured during this pretest.

A 2-minute stimulation at predetermined fixed temperature was used to evaluate differences in pain responses before and after the cold pressor test (CPT) to evaluate the inhibitory conditioned pain modulation (ICPM). The experimental temperature corresponded to a temperature predetermined to induce 50% pain rating. Participants were not told that the temperature was remaining constant after the thermode reached their predetermined experimental temperature; they were asked to evaluate their pain using the COVAS.

Cold pressor test (CPT)

The CPT consisted in the immersion of the right arm up to the elbow for 2 minutes in a cold-water bath. Based on previous studies from our laboratory (27),

the temperature of the water was set at 12°C to ensure that the CPT was painful while tolerable for 2 minutes in FMS. During the test, subjects rated verbally their pain intensity every 15 seconds using a numerical pain rating scale.

Cardiac activity

Cardiac activity was measured as previously described by our group (18). Electrocardiogram (ECG) was recorded and analysed before the pain experiments (baseline) and during CPT. The baseline was recorded at the beginning of the session while participants were at rest. The ECG was recorded using a standard 3-lead montage sampled at a frequency of 1000 Hz using the PowerLab system with Chart software (AD Instruments, Colorado Springs, CO). Instantaneous RR intervals were obtained from the ECG waveform with a peak detection algorithm to detect successive R-waves. All data were manually checked to ensure that only normal-to-normal intervals were analysed. Heart rate variability (HRV) was analysed in the frequency domain. Fast Fourier transforms were used to calculate the power spectral density of HR oscillations. Low frequency (LF, 0.04-0.15 Hz) and high frequency (HF, 0.15-0.4 Hz) were distinguished from the spectrum analysis of HRV. LF and HF were used to evaluate the cardiac ANS activity (28). HRV in the LF range reflects baroreflex-mediated sympathetic activity, whereas variation in HF range constitutes a measure of cardiac vagal activity (28). Normalized units (nu) for HF and LF were computed and analyzed. Sympathovagal LF/HF ratios were not analysed considering that the sympathovagal balance indexed by the LF/HF ratio is already taken into account in normalized units (29). ANS responsivity to pain was determined only by heart rate change (due to variability in the immersion time in FMS subjects).

Peripheral hormonal levels

Blood samples were collected into serum separator tubes and were allowed to clot for 1 hour before centrifuging and pipetting the serum into aliquots, which were then immediately frozen at -80°C until assay. Serum levels of cortisol were

determined using electrochemiluminescent immunoassay methods (MODULAR from Roche) and DHEAS was analysed by a competitive chemiluminescent assay (Immulite 2000 from Siemens). Serum levels of DHEA were determined by LC-MS/MS (liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry) method (MicroQuatro from Waters). Testosterone was measured using a competitive immunoassay on the ADVIA Centaur Testosterone assay using the manufacturer's protocol for serum (Siemens Medical Solutions). All assays were done by the Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke laboratory. The assay protocols are available upon request.

Statistical analyses

Potential differences between FMS patients and HC in hormones, psychophysical measures and ANS variables were examined using analyses of variance with group as the independent variable. Age, BMI and/or time of blood test were used as covariates (30, 31). In FMS patients as well as in HC, we examined relationships between hormones, psychophysical measures, symptoms and ANS measures using Pearson's partial correlation analyses. For these correlation analyses, outlier hormonal variables were carefully excluded, using routine medical normative values. For all analyses, the level of significance was set at $p < 0.05$.

Results

Population description

Table 1 describes the demographic profile and symptomatology of our FMS population. The symptomatology was not measured in healthy controls. FMS subjects have a BMI average slightly higher than HC (student-*t* test, FMS (n = 40): 30.19 ± 6.40 vs. HC (n = 18) 24.50 ± 5.26 , $t = -3.296$, $p = 0.002$). A tendency to be overweight in FMS population have been previously reported (32). Based on available normative data, subjects included in this study had moderate FMS severity symptoms (33), mild anxiety (24) and depression (23), they had poor sleep quality (25) and a relatively low quality of life (34).

Fibromyalgia patients (n = 40)	Mean \pm SD
Age (years)	50.1 \pm 10.5
Body Mass Index (BMI)	30.2 \pm 6
Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQ) total score	57.6 \pm 16.5
Physical impairment	1.5 \pm 0.6
Feel good	4.6 \pm 1.9
Missed work‡	0.9 \pm 1.5 (n=10)
Do job‡	5.6 \pm 1.8 (n=10)
Pain	6.7 \pm 1.8
Fatigue	6.9 \pm 2.0
Rested	6.7 \pm 2.4
Stiffness	6.5 \pm 2.2
Anxiety	5.3 \pm 2.7
Depression	3.8 \pm 2.8
Hamilton Anxiety Scale (HAM-A)	9.7 \pm 3.8
Hamilton Depression Scale (HAM-D)	11.3 \pm 4.5
Pittsburg Sleep Quality Index (PSQI)	11.1 \pm 4.4
Quality of Life Enjoyment and Satisfaction Questionnaire (Q-LES-Q)	40.6 \pm 10.5
Tender points threshold (kg)	1.2 \pm 0.8
Number of tender points	17.8 \pm 0.6

Table 1: Demographic data and questionnaire scores of FMS participants. SD indicates standard deviation. ‡: n = 10 for this criteria.

Comparison of FMS and HC population

Psychophysical measures

Experimental pain responses were compared between FMS and HC using ANCOVA (Table 2). FMS responded with lower pain threshold and tolerance and with higher pain ratings during CPT compared to HC. The variation of subjective pain before and after CPT, which is an indicator of ICPM measured as a delta (Δ), is significantly different between FMS and HC (higher ICPM in HC compared to FMS).

Heart rate variability (HRV) spectral analysis

Heart rate variability spectral analysis was compared between FMS and HC using ANCOVA with age as a covariate (Table 3). Differences between FMS and HC were observed in basal heart rate, LF nu and HF nu. The variation of the heart rate during the CPT did not significantly differ between the two groups. [Note: Sex hormones levels were correlated with HRV in FMS using partial correlation, with age, BMI and time of blood test when appropriate as covariates. No significant correlation was observed.]

	Experimental pain (mean \pm SD)		F	Sig.
	FMS (n=38)	HC (n=23)		
TP threshold ($^{\circ}$ C)	37.3 \pm 4.0	43.3 \pm 3.1	36.716	$p < 0.001$
TP tolerance ($^{\circ}$ C)	42.7 \pm 3.9	48.6 \pm 1.6	42.013	$p < 0.001$
CPT pain	82 \pm 15	54 \pm 26	26.655	$p < 0.001$
ICPM (Δ)	7 \pm 25	19 \pm 21	4.255	$p = 0.044$

Table 2: Experimental pain in fibromyalgia women and healthy controls. SD indicates standard deviation. FMS: Fibromyalgia subjects; HC: Healthy control subjects; TP: Thermal Pain; ICPM: Inhibitory conditioned pain modulation (diffuse noxious inhibitory control); CPT: Cold pressor test. ANCOVA using age as a covariate.

Power spectral analysis (Mean \pm SD)				
	FMS (n=39)	HC (n=11)	F	Sig.
Baseline HR (bpm)	76 \pm 10	67 \pm 10	7.004	$p = 0.011$
Baseline LF (nu)	63 \pm 20	47 \pm 19	5.698	$p = 0.021$
Baseline HF (nu)	29 \pm 16	47 \pm 22	9.503	$p = 0.003$
Variation of HR after CPT (% bmp)	7.6 \pm 6.7	8.6 \pm 6.5	0.190	NS

Table 3: Power spectral analysis in fibromyalgia women and healthy controls. SD indicates standard deviation; FMS: Fibromyalgia subjects; HC: Healthy control subjects; HR: Heart rate; LF nu: Low frequency power in normalized unit; HF nu: High frequency power in normalized unit. ANCOVA using age as a covariate.

Hormone levels

Hormone concentrations were compared between FMS and HC using ANCOVA (Table 4). Differences between FMS and HC were observed in cortisol levels.

Correlational study with hormones

Clinical symptoms

Hormone levels were correlated with clinical symptoms in FMS (Table 5). DHEAS is correlated with PSQI and the tender points threshold. Although not statistically significant, positive correlations between DHEAS, FIQ and depression scores were observed.

Psychophysical measures

Hormones levels were correlated with experimental pain responses in HC and FMS subjects (Table 6). There are significant positive correlations between cortisol levels and the ICPM (Δ). This result means that high cortisol levels are associated with high pain inhibition. Moreover, DHEAS, testosterone and DHEAS/DHEA ratio are all correlated with CPT rating in this population. A non-significant trend for a correlation between DHEAS/DHEA and pain tolerance is also found in FMS. Finally, relationships between DHEA levels and DHEAS/DHEA ratio and the pain tolerance were observed in HC subjects.

	Hormone levels (mean \pm SD)			
	FMS (n=38)	HC (n=18)	F	Sig.
DHEA (nmol/l)	10.5 \pm 12.0	9.1 \pm 4.5	1.235	NS
DHEAS (μ mol/l)	2.3 \pm 1.8	2.9 \pm 2.0	1.754	NS
TEST (ng/dL)	17.2 \pm 16.1	12.6 \pm 4.7	0.886	NS
CORT (nmol/l)†	398 \pm 189	260 \pm 124	7.263	<i>p</i> = 0.010
CORT/DHEA†	67 \pm 82	36 \pm 19	0.446	NS
DHEAS/DHEA	0.09 \pm 0.17	0.10 \pm 0.09	0.051	NS

Table 4: Mean hormone levels in fibromyalgia women and healthy control. SD indicates standard deviation; FMS: Fibromyalgia subjects ; HC: Healthy control subjects; DHEA: Dehydroepiandrosterone; DHEAS: Dehydroepiandrosterone sulfate; TEST: testosterone; CORT: Cortisol. ANCOVA using age and BMI as covariates. †: time of the blood test was used as a covariate.

	CORT [†]	DHEA	DHEAS	TEST	CORT/ DHEA [†]	DHEAS/ DHEA
FIQ total score	-.081	-.025	.314^T	-.156	-.151	.211
Pain	-.130	-.204	.183	-.161	.032	.061
HAM-A	-.134	-.121	.277	-.167	-.076	.151
HAM-D	-.024	-.056	.315^T	-.138	-.190	.153
PSQI	.022	.053	.407*	-.115	-.264	.268
Q-LES-Q	-.008	-.123	-.164	.003	-.038	-.135
Tender points threshold	-.206	-.288	-.370*	-.122	-.065	-.286

Table 5: Correlation between hormones and clinical symptoms in fibromyalgia women (n=40), controlled for age and BMI. FIQ: Fibromyalgia Impact Questionnaire; HAM-A: Hamilton Anxiety Scale; HAM-D: Hamilton Depression Scale; PSQI: Pittsburgh Sleep Quality Index; Q-LES-Q: Quality of Life Enjoyment and Satisfaction Questionnaire; CORT: Cortisol; DHEA: Dehydroepiandrosterone; DHEAS: Dehydroepiandrosterone sulfate; TEST: Testosterone. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ^T: p value between 0.51 and 0.055, considered as a trend. [†]: covariates for time of the blood test.

	CORT [†]	DHEA	DHEAS	TEST	CORT/ DHEA [†]	DHEAS/ DHEA
<i>Fibromyalgia subjects</i>						
TP Threshold (°C)	-.141	.001	-.060	-.043	-.224	-.095
TP Tolerance (°C)	.044	-.078	-.238	.248	-.068	-.346^T
CPT reported pain	-.096	-.092	.342*	-.352*	.019	.362*
ICPM (Δ)	.384*	.173	.059	.085	-.032	.064
<i>Healthy subjects</i>						
TP Threshold (°C)	.421	.356	.443	.291	.115	.224
TP Tolerance (°C)	-.048	.558*	.423	.134	-.484	.567*
CPT reported pain	.014	-.416	-.183	.015	.339	-.431
ICPM (Δ)	.034	-.337	.366	.130	.298	.017

Table 6: Correlation between hormones and pain perception in fibromyalgia women (n=40) and healthy subjects (n = 19), controlled for age. DHEA: Dehydroepiandrosterone; DHEAS: Dehydroepiandrosterone sulfate; TEST: Testosterone; CORT: Cortisol; TP: Thermal Pain; ICPM: Inhibitory conditioned pain modulation; CPT: Cold Pressor Test. * $p < 0.05$; ^T: p value between 0.51 and 0.055, considered as a trend. † : covariated for time of blood test.

Discussion

To our knowledge, this is the first study examining the relationship between androgens, ANS, clinical symptoms and experimental pain in FMS patients and HC. FMS patients in this study showed moderate symptoms severity (33), mild anxiety (24) and depression (23), they had poor sleep quality (25) and a relatively low quality of life (34). Moreover, their pain response to experimental nociceptive stimulations demonstrated an hyperalgesic state, expressed by higher pain ratings, lower thermal pain thresholds, and less pain inhibition after a conditioning stimulus (ICPM) compared to healthy subjects. These signs of hyperalgesia are consistent with results from previous studies among this population (27, 35). Furthermore, higher basal heart rate, higher basal sympathetic activity (LF nu) and lower basal parasympathetic activity were observed in FMS. This hyperactive sympathetic activity at rest has been demonstrated previously (36). Finally, the variation in cortisol levels between FMS and HC suggests an allostatic load in FMS (37).

An important result of this study is the difference in the basal hormonal levels between FMS and HC. Higher basal cortisol levels were observed in FMS patients. Furthermore, nine subjects had their cortisol levels higher than the normal limit defined by biological analyses center of the Centre Hospitalier Universitaire de l'Université de Sherbrooke. Even, if the alteration of cortisol levels is highly debated in FMS, this result is in accordance with previous studies (13, 38, 39). This increase in cortisol levels in FMS patients, in addition with the basal ANS alteration, is consistent with the idea of an allostatic load, a state that could be compared to a system that cannot relax when the stressful event is over. It also can be described as a lack of resiliency of the HPA axis (13). Furthermore, the hyporeactivity of the HPA axis in a stressful situation has been shown repeatedly in FMS (12, 40, 41).

Our results showed a higher basal heart rate in FMS subjects compared to HC. Furthermore, our FMS subjects presented higher LF nu and lower HF nu, which indicate a higher sympathetic activity and a lower parasympathetic (vagal)

activity. These results are completely in line with previous results (17, 18, 42). In fact, FMS patients are often characterized by a high basal sympathetic activity and an impaired sympathetic reaction to stress (42). However, we did not observe any difference of the heart rate variation during the CPT between FMS and HC subjects. It is known that sympathetic nervous system can have an influence on adrenal hormone secretion (20). In our case, no significant correlation was observed between HRV and hormone levels.

Many observations have suggested that androgenic metabolites and testosterone are able to produce antinociceptive effects (43-46). In our case, there were no between-group differences in testosterone concentrations. However, we observed a negative correlation between testosterone levels and pain reported during the CPT. This result means that subjects with high testosterone levels are reporting less pain during the CPT. It is in complete agreement with previous reported literature (45, 46).

The quantification of DHEAS positively correlates with poor sleep quality, high FIQ score (FMS symptoms severity), high depression score and negatively correlates with tender point threshold. This means that high DHEAS levels seem to be associated with a greater severity of FMS symptomatology. Echoing these clinical relationships, the positive correlations were also observed in this study between DHEAS levels, DHEAS/DHEA ratio and pain ratings during CPT in FMS. On the other hand, in HC, positive correlations were found between DHEA and DHEAS/DHEA and pain tolerance. A few clinical studies have related DHEAS levels to pain ratings in various chronic pain pathologies (47-51). Low DHEA and DHEAS levels have been often associated to many disabilities such as insomnia, psychological distress and pain (47, 52). It has been reported that women with low DHEAS levels have a greater number of pain sites (53). Low DHEAS is also a good predictor of pain 12 months later in a working population (47). However, many other studies did not observe any effect of DHEA or DHEAS on pain perception (54-56). It is important to mention that a lot of these preceding studies used only the FIQ or a numeric scale for pain evaluation. Many

of those did not control for age, BMI and time of the blood test in their analyses, which may have biased the results. In counterpart, pre-clinical studies have examined the involvement of DHEA and DHEAS treatment, injected directly at the spinal level, on nociceptive responses in rats (57). They have shown that treatment with DHEA and/or DHEAS produces an early pronociceptive effect on pain perception and a late antinociceptive effect (43, 58). In this study, the positive relationship between DHEA, DHEAS and pain perception observed seems to be representative of the pronociceptive effect of DHEAS. In fact, this effect could be explained by the binding of DHEAS to NMDA receptors, which is an important player in pain transmission. In summary, this is the first time that an opposite effect of DHEAS on pain perception in FMS and HC is reported, as well as a correlation between cortisol and ICPM. However, it is important to mention that this is the first time that these measures were done in both populations, using clinical symptoms and experimental pain evaluation. These results are exploratory, and will need to be described in a larger population, particularly knowing that it might be different in pre-menopausal and menopausal women. Finally, these results are taking into account many factors that are often forgotten or dismissed in this kind of studies, such as BMI.

The large diversity of questionnaires used, combined with psychophysical measures and the use of many control variables are the main strengths of the current study. Moreover, we used molar ratio of cortisol, DHEAS and DHEA to demonstrate the direction of the adrenal pathway and the enzyme activity. Indeed, it is known that DHEA and DHEAS is part of the retrocontrol loop of the corticosteroid synthesis, which is directly stimulated by ACTH release (59, 60). Consequently, the relation between cortisol and DHEA shows the balance between cortisol and androgens synthesis (20). Also, the molar ratio of DHEAS/DHEA represents the combined action of the DHEA sulfotransferase and the DHEAS sulfatase in the direction of DHEAS (20).

Conclusion

Taken together, these results support the hypothesis of an allostatic load in FMS. This conclusion is supported by hormone dosages, HRV spectral analysis and related to both clinical symptoms and psychophysical measures. The precise mechanisms underlying correlations of DHEA and DHEAS with pain perception and clinical symptoms remain elusive and further investigations are needed.

Acknowledgments

Dr Marchand is a supported member of the Centre de recherche clinique Étienne-Le Bel du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke and holds grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). MA Coulombe is holder of a doctoral research award from the (CIHR). Dr Potvin is holder of a Junior 1 researcher scholarship from the Quebec Funds of Health Research. Part of the current study was funded by AstraZeneca. AstraZeneca had no role in the study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. A special acknowledgment to Pr Charaf Anhadi for its help on testosterone dosages.

References

1. Fillingim RB, King CD, Ribeiro-Dasilva MC, Rahim-Williams B, Riley JL, 3rd. Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. *J Pain*. 2009;10(5):447-85.
2. Mogil JS. Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon. *Nat Rev Neurosci*. 2012;13(12):859-66.
3. Wolfe F, Clauw DJ, Fitzcharles MA, Goldenberg DL, Katz RS, Mease P, et al. The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010;62(5):600-10.
4. Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, Bennett RM, Bombardier C, Goldenberg DL, et al. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis Rheum*. 1990;33(2):160-72.
5. Wolfe F, Ross K, Anderson J, Russell IJ, Hebert L. The prevalence and characteristics of fibromyalgia in the general population. *Arthritis Rheum*. 1995;38(1):19-28.
6. Gaumond I. Hormones sexuelles et mecanismes endogenes de modulation de la douleur. *Douleur analg*. 2009;22:146-51.
7. Poisbeau P, Patte-Mensah C, Keller AF, Barrot M, Breton J-D, Luis-Delgado OE, et al. Inflammatory pain upregulates spinal inhibition via endogenous neurosteroid production. *J Neurosci*. 2005;25 (50):11768-76.
8. Belelli D, Lambert JJ. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6 (7):565-75.
9. Weaver CE, Jr., Marek P, Park-Chung M, Tam SW, Farb DH. Neuroprotective activity of a new class of steroidal inhibitors of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(19):10450-4.
10. Weaver CE, Jr., Park-Chung M, Gibbs TT, Farb DH. 17beta-Estradiol protects against NMDA-induced excitotoxicity by direct inhibition of NMDA receptors. *Brain Res*. 1997;761(2):338-41.
11. Alves SE, Weiland NG, Hayashi S, McEwen BS. Immunocytochemical localization of nuclear estrogen receptors and progestin receptors within the rat dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol*. 1998;391(3):322-34.
12. Crofford LJ. The hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis in fibromyalgia and chronic fatigue syndrome. *Z Rheumatol*. 1998;57 Suppl 2:67-71.
13. Crofford LJ, Young EA, Engleberg NC, Korszun A, Brucksch CB, McClure LA, et al. Basal circadian and pulsatile ACTH and cortisol secretion in patients with fibromyalgia and/or chronic fatigue syndrome. *Brain Behav Immun*. 2004;18(4):314-25.
14. McLean SA, Williams DA, Harris RE, Kop WJ, Groner KH, Ambrose K, et al. Momentary relationship between cortisol secretion and symptoms in patients with fibromyalgia. *Arthritis Rheum*. 2005;52(11):3660-9.
15. McEwen BS, Stellar E. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Archives of internal medicine*. 1993;153(18):2093-101.
16. Peters A, McEwen BS. Introduction for the allostatic load special issue. *Physiol Behav*. 2012;106(1):1-4.

17. Cohen H, Neumann L, Kotler M, Buskila D. Autonomic nervous system derangement in fibromyalgia syndrome and related disorders. *The Israel Medical Association journal : IMAJ*. 2001;3(10):755-60.
18. Chalaye P, Goffaux P, Bourgault P, Lafrenaye S, Devroede G, Watier A, et al. Comparing pain modulation and autonomic responses in fibromyalgia and irritable bowel syndrome patients. *Clin J Pain*. 2012;28(6):519-26.
19. Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Trzeclak WH, Usadel H, Guse-Behling H, Waterman MR, et al. Adrenaline stimulates cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 mRNA accumulation in bovine adrenocortical cells. *J Endocrinol*. 1991;131(2):R5-8.
20. Kizildere S, Gluck T, Zietz B, Scholmerich J, Straub RH. During a corticotropin-releasing hormone test in healthy subjects, administration of a beta-adrenergic antagonist induced secretion of cortisol and dehydroepiandrosterone sulfate and inhibited secretion of ACTH. *Eur J Endocrinol*. 2003;148(1):45-53.
21. Wolfe F, Anderson J, Harkness D, Bennett RM, Caro XJ, Goldenberg DL, et al. Health status and disease severity in fibromyalgia: results of a six-center longitudinal study. *Arthritis Rheum*. 1997;40(9):1571-9.
22. Perrot S, Dumont D, Guillemin F, Pouchot J, Coste J, French Group for Quality of Life R. Quality of life in women with fibromyalgia syndrome: validation of the QIF, the French version of the fibromyalgia impact questionnaire. *J Rheumatol*. 2003;30(5):1054-9.
23. Hamilton M. A rating scale for depression. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1960;23:56-62.
24. Hamilton M. The assessment of anxiety states by rating. *The British journal of medical psychology*. 1959;32(1):50-5.
25. Buysse DJ, Reynolds CF, 3rd, Monk TH, Berman SR, Kupfer DJ. The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Res*. 1989;28(2):193-213.
26. Stevanovic D. Quality of Life Enjoyment and Satisfaction Questionnaire-short form for quality of life assessments in clinical practice: a psychometric study. *Journal of psychiatric and mental health nursing*. 2011;18(8):744-50.
27. Potvin S, Larouche A, Normand E, de Souza JB, Gaumond I, Grignon S, et al. DRD3 Ser9Gly polymorphism is related to thermal pain perception and modulation in chronic widespread pain patients and healthy controls. *J Pain*. 2009;10(9):969-75.
28. Task Force. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation*. 1996;93(5):1043-65.
29. Burr RL. Interpretation of normalized spectral heart rate variability indices in sleep research: a critical review. *Sleep*. 2007;30(7):913-9.
30. Labrie F, Belanger A, Cusan L, Gomez JL, Candas B. Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(8):2396-402.

31. Larivière M, Goffaux P, Marchand S, Julien N. Changes in pain perception and descending inhibitory controls start at middle age in healthy adults. *Clin J Pain*. 2007;23(6):506-10.
32. Bennett RM, Jones J, Turk DC, Russell IJ, Matallana L. An internet survey of 2,596 people with fibromyalgia. *BMC Musculoskelet Disord*. 2007;8:27.
33. Bennett RM, Bushmakina AG, Cappelleri JC, Zlateva G, Sadosky AB. Minimal clinically important difference in the fibromyalgia impact questionnaire. *J Rheumatol*. 2009;36(6):1304-11.
34. Endicott J, Nee J, Harrison W, Blumenthal R. Quality of Life Enjoyment and Satisfaction Questionnaire: a new measure. *Psychopharmacol Bull*. 1993;29(2):321-6.
35. Normand E, Potvin S, Gaumond I, Cloutier G, Corbin J-F, Marchand S. Pain inhibition is deficient in chronic widespread pain but normal in major depressive disorder. *J Clin Psychiatry*. 2011;72(2):219-24.
36. Cohen H, Neumann L, Shore M, Amir M, Cassuto Y, Buskila D. Autonomic dysfunction in patients with fibromyalgia: application of power spectral analysis of heart rate variability. *Semin Arthritis Rheum*. 2000;29(4):217-27.
37. Martinez-Lavin M, Vargas A. Complex adaptive systems allostasis in fibromyalgia. *Rheum Dis Clin North Am*. 2009;35(2):285-98.
38. Riedel W, Layka H, Neeck G. Secretory pattern of GH, TSH, thyroid hormones, ACTH, cortisol, FSH, and LH in patients with fibromyalgia syndrome following systemic injection of the relevant hypothalamic-releasing hormones. *Z Rheumatol*. 1998;57 Suppl 2:81-7.
39. Catley D, Kaell AT, Kirschbaum C, Stone AA. A naturalistic evaluation of cortisol secretion in persons with fibromyalgia and rheumatoid arthritis. *Arthritis care and research : the official journal of the Arthritis Health Professions Association*. 2000;13(1):51-61.
40. Crofford LJ, Pillemer SR, Kalogeras KT, Cash JM, Michelson D, Kling MA, et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis perturbations in patients with fibromyalgia. *Arthritis Rheum*. 1994;37(11):1583-92.
41. Griep EN, Boersma JW, de Kloet ER. Altered reactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the primary fibromyalgia syndrome. *J Rheumatol*. 1993;20(3):469-74.
42. Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Diana A, Doria A, Furlan R. Increased neural sympathetic activation in fibromyalgia syndrome. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1069:109-17.
43. Kibaly C, Meyer L, Patte-Mensah C, Mensah-Nyagan AG. Biochemical and functional evidence for the control of pain mechanisms by dehydroepiandrosterone endogenously synthesized in the spinal cord. *FASEB J*. 2008;22(1):93-104.
44. Aloisi AM, Ceccarelli I, Fiorenzani P, De Padova AM, Massafra C. Testosterone affects formalin-induced responses differently in male and female rats. *Neurosci Lett*. 2004;361(1-3):262-4.
45. Gaumond I, Arsenaault P, Marchand S. Specificity of female and male sex hormones on excitatory and inhibitory phases of formalin-induced nociceptive responses. *Brain Res*. 2005;1052(1):105-11.

46. Aloisi AM, Bachiocco V, Costantino A, Stefani R, Ceccarelli I, Bertaccini A, et al. Cross-sex hormone administration changes pain in transsexual women and men. *Pain*. 2007;132(Suppl1):S60-7.
47. Schell E, Theorell T, Hasson D, Arnetz B, Saraste H. Stress biomarkers' associations to pain in the neck, shoulder and back in healthy media workers: 12-month prospective follow-up. *Eur Spine J*. 2008;17(3):393-405.
48. Finset A, Overlie I, Holte A. Musculo-skeletal pain, psychological distress, and hormones during the menopausal transition. *Psychoneuroendocrinology*. 2004;29(1):49-64.
49. Kilts JD, Tupler LA, Keefe FJ, Payne VM, Hamer RM, Naylor JC, et al. Neurosteroids and self-reported pain in veterans who served in the U.S. Military after September 11, 2001. *Pain Med*. 2010;11(10):1469-76.
50. Coulombe M-A, Potvin S, Paul-Savoie É, Corbin J-F, Gaumond I, Marchand S, editors. Peripheral DHEA-S levels are decreased in fibromyalgia and negatively correlated with thermal hyperalgesia. 13th World Congress on Pain2010.
51. Freitas RP, Lemos TM, Spyrides MH, Sousa MB. Influence of cortisol and DHEA-S on pain and other symptoms in post menopausal women with fibromyalgia. *Journal of back and musculoskeletal rehabilitation*. 2012;25(4):245-52.
52. Maninger N, Wolkowitz OM, Reus VI, Epel ES, Mellon SH. Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). *Front Neuroendocrinol*. 2009;30(1):65-91.
53. Morrison MF, Katz IR, Parmelee P, Boyce AA, TenHave T. Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) and psychiatric and laboratory measures of frailty in a residential care population. *Am J Geriatr Psychiatry*. 1998;6(4):277-84.
54. Yoshikawa GT, Heymann RE, Helfenstein M, Jr., Pollak DF. A comparison of quality of life, demographic and clinical characteristics of Brazilian men with fibromyalgia syndrome with male patients with depression. *Rheumatol Int*. 2010;30(4):473-8.
55. Finckh A, Berner IC, Aubry-Rozier B, So AK. A randomized controlled trial of dehydroepiandrosterone in postmenopausal women with fibromyalgia. *J Rheumatol*. 2005;32(7):1336-40.
56. Desein PH, Shipton EA, Joffe BI, Hadebe DP, Stanwix AE, Van der Merwe BA. Hyposecretion of adrenal androgens and the relation of serum adrenal steroids, serotonin and insulin-like growth factor-1 to clinical features in women with fibromyalgia. *Pain*. 1999;83(2):313-9.
57. Yoon SY, Roh DH, Seo HS, Kang SY, Han HJ, Beitz AJ, et al. Intrathecal injection of the neurosteroid, DHEAS, produces mechanical allodynia in mice: involvement of spinal sigma-1 and GABA receptors. *Br J Pharmacol*. 2009;157(4):666-73.
58. Gasinska E, Bujalska-Zadrozny M, Sar M, Makulska-Nowak H. Influence of acute and subchronic oral administration of dehydroepiandrosterone (DHEA) on nociceptive threshold in rats. *Pharmacological reports : PR*. 2012;64(4):965-9.

59. Leowattana W. DHEAS as a new diagnostic tool. *Clin Chim Acta*. 2004;341(1-2):1-15.
60. Nieschlag E, Loriaux DL, Ruder HJ, Zucker IR, Kirschner MA, Lipsett MB. The secretion of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulphate in man. *J Endocrinol*. 1973;57(1):123-34.

ARTICLE 2

Male have a lower nociceptive threshold than female using a dynamic hot plate model: Greater involvement of gonadal hormones compared to derived metabolites

Auteurs de l'article: Marie-Andrée Coulombe, Serge Marchand, Pierrick Poisbeau.

Statut de l'article: soumis à *Brain Research* le 28 février 2013

Avant-propos: J'ai participé activement à toutes les étapes de ce projet de recherche, que ce soit l'écriture du protocole, les soumissions éthiques, la chirurgie des animaux, les expérimentations comportementales, l'analyse des données et l'écriture du manuscrit. Prs Marchand et Poisbeau m'ont particulièrement aidé en révisant et corrigeant le manuscrit final.

Résumé : Le test de la plaque chaude dynamique (PCD) est très pertinent dans l'étude de la douleur. Il permet à la fois d'évaluer l'hyperalgésie et l'allodynie, tout en produisant des valeurs fiables et reproductibles. En 2009, Ipek Yalcin décrit une nouvelle PCD commercialisée par Bioseb et contrôlée par ordinateur (Yalcin *et al.*, 2009b). Ils ont établi une méthode d'évaluation des comportements nociceptifs des rats et des souris pour l'utilisation de la plaque chaude dynamique (PCD) ainsi que la plaque froide dynamique (PFD). Cette méthode a été validée pour les animaux avec ou sans symptômes douloureux (Yalcin *et al.*, 2009b). La différence de perception de la douleur entre les mâles et les femelles est bien décrite dans la littérature (Fillingim *et al.*, 2009). L'objectif de ce projet était de vérifier si, lors de ce test, 1) une différence entre les mâles et les femelles était présente, 2) l'implication des hormones gonadiques chez ces animaux, et 3) la participation des métabolites 3α -réduits lors de ce test. Les résultats de ce projet ont été très surprenants. En effet, les résultats démontrent que les mâles ont un

seuil de douleur plus faible que celui des femelles. En l'absence de leurs gonades, tant les mâles que les femelles présentaient des seuils de douleur plus élevés que leurs équivalents avec gonades. Finalement, les métabolites $3\alpha5\alpha$ -réduits semblent uniquement avoir un effet sur la douleur chez les mâles. Plusieurs questions sont soulevées par ce projet de recherche, notamment par rapport à l'intégration de l'information nociceptive et à la gestion d'une stimulation à risque. Les résultats inattendus observés ont permis de diriger la réflexion concernant les différences de perception de la douleur vers l'importance et les nuances associées à l'intégration de l'information nociceptive et à la gestion d'une stimulation à risque, de même qu'aux rôles éthologiques des différences de perception de la douleur, mais aussi de la gestion des situations douloureuse, chez l'humain et l'animal.

Male have a lower nociceptive threshold than female using a dynamic hot plate model: Greater involvement of gonadal hormones compared to derived metabolites

Coulombe, Marie-Andrée^{1,2}; Marchand, Serge¹; Poisbeau, Pierrick².

¹ Département de chirurgie, Service de neurochirurgie, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

² Centre National de la Recherche Scientifique et Université de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Département Nociception et Douleur, Strasbourg, France

Corresponding author

Prof. Pierrick Poisbeau, CNRS UPR 3212, Département Nociception et Douleur, 21 rue René Descartes, F-67084 Strasbourg cedex, France.

Phone : (+33) 3 68 85 14 76 / Fax : (+33) 3 88 61 33 47

Email : poisbeau@unistra.fr

Abstract

Difference of nociceptive responses between male and female is observed in many behavioral model. Recently, a dynamic hot plate has been described using a slow ramp of temperature. The aim of this study was to evaluate the involvement of sex hormones, and their $3\alpha,5\alpha$ reduce metabolites on pain behaviors induced by the dynamic hot plate in mice. In this study, the dynamic hot plate was used to study: 1) the involvement of hormonal status using comparison between gonadectomised or sham-gonadectomised male and female C57BL/6j mice; 2) the contribution of afferent fibers of these hormonal status using topical application of capsaicin or dimethyl sulfoxide (DMSO) on mice hind paws; and 3) the involvement of derived metabolites of sex steroids, using provera injections, on nociceptive behaviors. Results: 1) surprisingly, male mice showed lower nociceptive threshold compared to female mice, whereas gonadectomy of male and female mice increased it; 2) application of topical capsaicin decreased pain threshold in every group; 3) provera treatment increased nociceptive threshold in both castrated and sham-castrated male mice. This effect of provera injection is in good agreement with modulation on nociceptive behavior during formalin test. Interestingly, these results not only confirm that the hormonal status is affecting thermal nociception but also highlight the complex and sometimes paradoxal shaping of sex-specific pain responses. Results obtained using this technique raised several questions about sexual dimorphism in pain perception particularly in regard to escapable vs inescapable pain models.

1. Introduction

In 2009, Yalcin and collaborators described a commercial dynamic hot plate precisely controlled by computer (Yalcin et al., 2009). They studied a dynamic method evaluating thermal nociception, and they established a reliable method to score mouse and rat nociceptive behaviors, using a dynamic hot plate (DHP) and a dynamic cold plate (DCP). They validated their method in animals with and without pain symptoms (Yalcin et al., 2009). This DHP provides several advantages compared to the original fixed temperature hot plate. It reduces the stress associated with the experimentation (Wilson and Mogil, 2001), it produces an experimental pain model sensitive to weak analgesia as obtained with ibuprofen and paracetamol (Hunskar et al., 1986a), and finally, offers the possibility to modify the heating slope. When the heating rate is slow ($1^{\circ}\text{C}/\text{s}$), C-type thermoreceptors are predominantly activated (Yeomans et al., 1996; Yeomans and Proudfit, 1996). More importantly, when the temperature increases gradually, there is a successive, organized and unalterable sequence of activation of thermoreceptors (Duclaux and Kenshalo, 1980; Treede et al., 1995; Wall et al., 2006). Thus, it allows the characterization of C-type and A-type nociceptors activation.

It is known that threshold of activation of mechano-heat-sensitive C-fibers (CMH) depends on the temperature reached at the tissue depth of these receptors (Tillman et al., 1995). A method used to secure that the heat will have the time to reach these receptors is to use a slow ramp of increase temperature or a prolonged thermal stimulation (Tillman et al., 1995). Interestingly, typical CMH heat threshold range between $41\text{-}49^{\circ}\text{C}$ (LaMotte and Campbell, 1978), but the use of a long stimulus is more likely to provide a heat threshold ranging between $39\text{-}41^{\circ}\text{C}$ (Tillman et al., 1995). Similarly, type I A-fiber nociceptors, also called high-threshold mechanoreceptors, are generally responsive to heat threshold of around 53°C , but when using long duration stimulation, the threshold decreases, ranging between $40\text{-}50^{\circ}\text{C}$ (Wall et al., 2006).

Several studies have shown that women are more sensitive to experimental heat pain than men. Moreover, women often report lower pain threshold and lower tolerance compared to men (Fillingim et al., 2009). In animal models, higher nociceptive thresholds of males are also often described (Aloisi and Bonifazi, 2006; Gaumond et al., 2002; Kuba and Quinones-Jenab, 2005; Leo et al., 2008). This difference of nociceptive responses between males and females may be associated with organizational, dimorphism established during the period of sexual differentiation, or with activational mechanisms, acute effect maintained by circulating levels of sex hormones on a fully developed system (Borzan and Fuchs, 2006; Lacroix-Fralish et al., 2008). Activational mechanisms of sex hormones on pain transmission and modulation are often associated with the modulation of neurotransmission in the central nervous system (CNS) (Aloisi et al., 2003; Aloisi and Bonifazi, 2006; Bethea et al., 2002). In fact, sex hormone receptors are located throughout the CNS and the peripheral nervous system (PNS) (Loyd and Murphy, 2008; McEwen, 2001; Pfaff et al., 2000). Interestingly, through their binding to nuclear receptors, gonadal hormones may regulate the transcription and the expression of neurotransmitter receptors or ion channels (Cyr et al., 2000a; Cyr et al., 2000b; D'Souza et al., 2003; Truss and Beato, 1993). However, gonadal hormones may also act as neuroactive steroids. It has been shown that sex steroids can bind to membrane receptors, ligand-gated ion channels, or voltage-gated ion channels to modulate neuronal excitability (McEwen et al., 1991; Moggs and Orphanides, 2001; Rupprecht, 2003; Simoncini and Genazzani, 2003; Smith et al., 1988).

Since Yalcin and collaborators established a reliable method using a dynamic hot plate (DHP) (Yalcin et al., 2009), the aim of this study was to evaluate the involvement of sex hormones, and their $3\alpha 5\alpha$ reduce metabolites ($3\alpha 5\alpha$ NS, $3\alpha 5\alpha$ neuroactive steroids) on pain behaviors induced by the dynamic hot plate in mice. The type of afferent fiber primarily involved in this nociception model was evaluated using capsaicin (C fibers sensitization) and DMSO ($\alpha\delta$ fibers sensitization) topical applications.

2. Results

2.1 *Dynamic hot plate*

2.1.1 Nociceptive behaviors

Each graphic of figure 1 represents the nociceptive response (jumps) of different mice groups to an increasing thermal hot stimulation delivered by the dynamic hot plate at a rate of 2°C/min, from a value of 30°C to 46°C and a subsequent sustained 5 minutes plateau at 46°C. Since each mouse reacted differently to the thermal stimulus and reached the cut-off limit at different time-points, comparison of curves using a two-way ANOVA test was impossible. However, a first look to these curves allows us to observe that, surprisingly, sham-operated females (F_SHAM) show less nociceptive behaviors than sham-operated males (M_SHAM) (Figure 1A). Gonadectomized mice (ovariectomized females or castrated males) show less nociceptive behaviors compared to sham-operated male and female mice (Figure 1B and 1C). Finally, castrated males had greater responses to the nociceptive stimulus than ovariectomized females (Figure 1D).

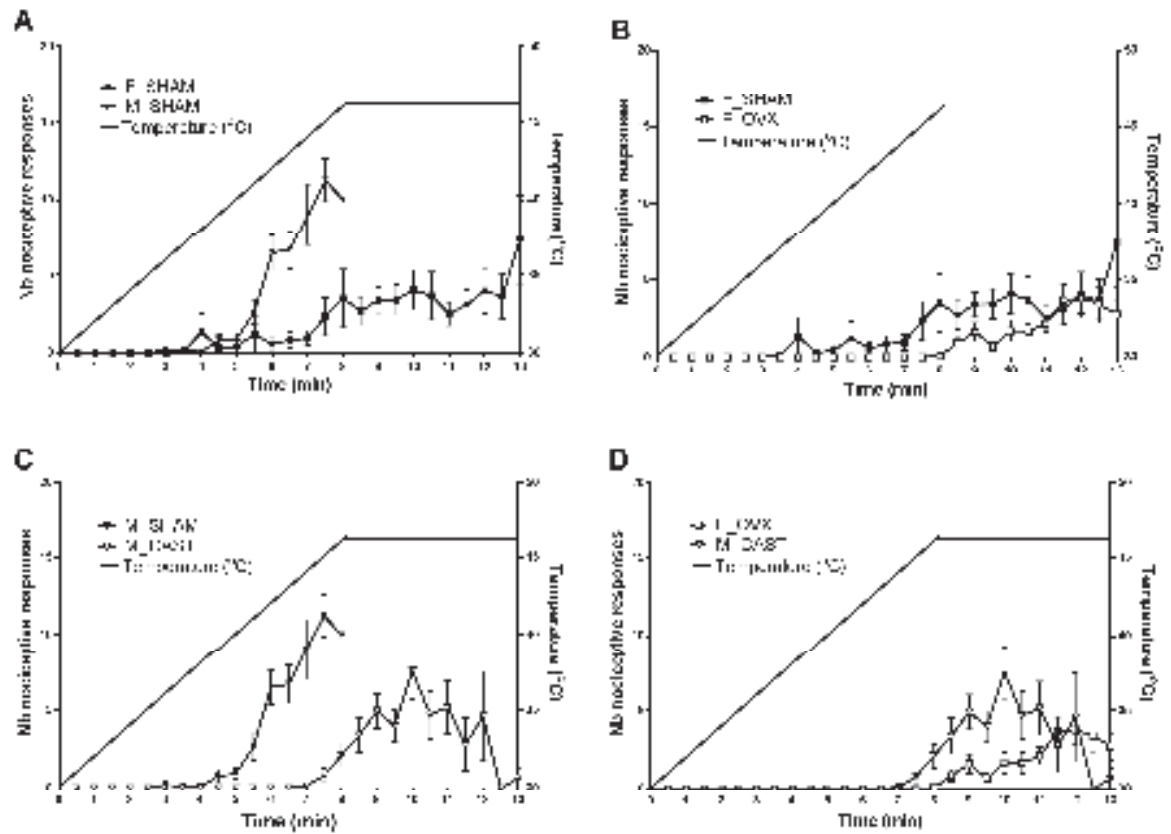


Figure 1

Mean number of nociceptive behaviors calculated every 30 seconds for male (M_SHAM: $n = 24$), female (F_SHAM: $n = 24$) and gonadectomized mice (M_CAST: $n = 22$; F_OVX: $n = 24$). Data are expressed as means \pm SEM.

2.1.2 Thresholds and latency

A straightforward way to analyze these data is to measure the nociceptive threshold, which is represented here by the latency (in minute) to observe the first nociceptive behavior. In addition, the tolerance (the latency to reach the cut-off limit, in minutes) can be measured. We interpret the reach of the cut-off limit as a maximum. However, several mice did not show enough nociceptive behaviors to reach the cut-off limit, which initiate the measure of the percentage of mice that reach the cut-off limit. Finally, we analyzed the slope of the curve ((maximal nociceptive response – minimal nociceptive response)/(tolerance – threshold)).

The latency before the first jump (nociceptive threshold) was compared between groups (Figure 2A). The nociceptive thresholds of all groups were normally distributed. Thresholds were compared using a one-way ANOVA test and a Bonferroni post-hoc test was applied ($p < 0.0001$, $F = 42.48$). Female threshold was higher compared to male mice (F_SHAM: 8.2 ± 0.4 min vs. M_SHAM: 5.5 ± 0.3 min, $p < 0.001$, $t = 6.171$). As for castrated mice, ovariectomized mice showed an increased threshold compared to sham-operated mice (F_SHAM: 8.2 ± 0.4 min vs. F_OVX: 10.5 ± 0.3 min, $p < 0.001$, $t = 5.075$; M_SHAM: 5.5 ± 0.3 min vs. M_CAST: 8.5 ± 0.2 min, $p < 0.001$, $t = 6.696$). Finally, a greater nociceptive threshold was observed in F_OVX mice compared to M_CAST mice (F_OVX: 10.5 ± 0.3 min vs. M_CAST: 8.5 ± 0.2 min, $p < 0.001$, $t = 4.180$).

The latency before reaching the cut-off limit was measured in the different groups (Figure 2B). Latencies were normally distributed and were compared between the 4 groups using a one-way ANOVA ($p = 0.0001$, $F = 34.09$) with Bonferroni's multiple comparison post-hoc test. As observed with the measurement of nociceptive thresholds, female mice seemed to have a higher tolerance compared to male mice when comparing latencies to reach the cut off (F_SHAM: 9.7 ± 0.5 min vs M_SHAM: 6.5 ± 0.1 min, $p < 0.001$, $t = 7.072$). Gonadectomized mice show higher tolerance compared to sham-operated mice (F_OVX: 11.4 ± 0.4 min vs. F_SHAM:

9.7 ± 0.5 min, $p < 0.05$, $t = 2.963$; M_CAST: 9.6 ± 0.3 min vs. M_SHAM: 6.5 ± 0.1 min, $p < 0.001$, $t = 6.837$). Finally, ovariectomized mice show higher tolerance values compared to castrated mice (F_OVX: 11.4 ± 0.4 min vs. M_CAST: 9.6 ± 0.3 min, $p < 0.01$, $t = 3.148$).

Then, the percentage of mice having reached the maximal response was calculated (Figure 2C). A chi-square test was used to evaluate the relationship between the groups and the reach of the maximal response ($\alpha = 0.05$, $p < 0.0001$). Comparisons between groups were done using a chi-square with an adjusted α value ($\alpha/\text{nb of comparison}$, $0.05/4 = 0.0125$). No significant difference, but a trend was observed between F_SHAM and M_SHAM (F_SHAM: 79 % vs M_SHAM: 100 %, $p = 0.016$). These results suggest that F_SHAM are less susceptible to reach the cut-off limit compared to M_SHAM mice. No difference was observed between M_SHAM and M_CAST (M_SHAM: 100 % vs M_CAST: 86 %, $p = 0.061$). F_SHAM and M_CAST groups both show a higher percentage of mice having reached the cut-off limit compared to F_OVX (F_SHAM: 79% vs. F_OVX: 41%, $p = 0.011$; M_CAST: 86% vs. F_OVX: 41%, $p = 0.002$).

Finally, the increasing rate of the nociceptive behaviors (slope) was compared (figure 2D). These data were not normally distributed, so groups were compared using the non-parametric Kruskal-Wallis test ($p < 0.0001$, KW statistic: 25.99). A difference between male and female mice was observed. Male mice showed faster and greater number of nociceptive responses compared to female mice (F_SHAM: 4.0 ± 0.6 jumps/min vs. M_SHAM: 6.9 ± 0.5 jumps/min, $p < 0.01$, difference in rank sum -26.78).

No differences were observed between repetitive experiments (without treatment) in nociceptive thresholds (Data not shown, Spearman nonparametric correlation, Spearman $r = 0.80$ $p = 0.33$), survival (Data not shown, Spearman nonparametric correlation, Spearman $r = -0.74$, $p = 0.33$), tolerance (Data not shown,

Spearman nonparametric correlation, Spearman $r = 0.8$, $p = 0.33$) or slope (Data not shown, Spearman nonparametric correlation, Spearman $r = 0.40$, $p = 0.75$).

No differences has also been observed between the application of 50% saline:ethanol and saline on nociceptive thresholds (Data not shown, Wilcoxon matched-pairs signed rank test; $p > 0.05$), survival (Data not shown, Wilcoxon matched-pairs signed rank test; $p > 0.05$), tolerance (Data not shown, Wilcoxon matched-pairs signed rank test; $p > 0.05$) and slope (Data not shown, Wilcoxon matched-pairs signed rank test; $p > 0.05$).

Finally, no effect of treatment sequence was observed on nociceptive thresholds (Data not shown, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test for selected pairs, Kruskal-Wallis statistic 59.51; $p > 0.05$), survival (Data not shown, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test for selected pairs, $p > 0.05$), tolerance (Data not shown, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test for selected pairs, Kruskal-Wallis statistic 63.43; $p > 0.05$) or slope (Data not shown, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test for selected pairs, Kruskal-Wallis statistic 22.67, $p > 0.05$).

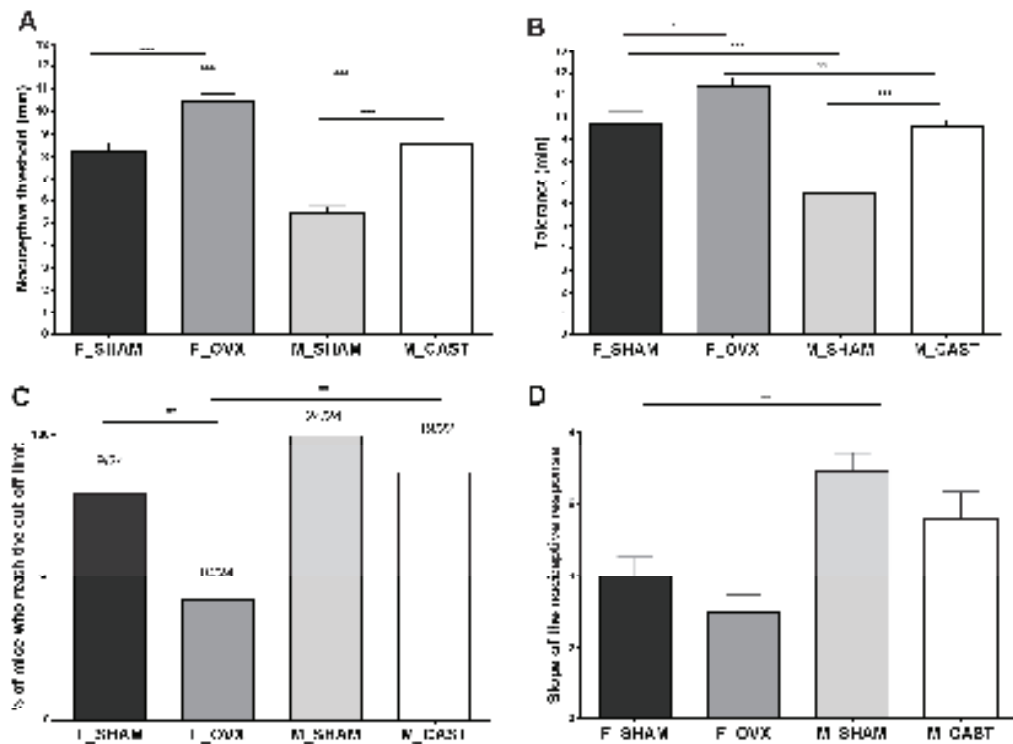


Figure 2

Histograms illustrating the mean nociceptive threshold (A), latency to the maximal nociceptive response allowed (min), percentage of mice who reach the maximal response (C) and latency between the first jump and the latency to the maximal response (seen as an increasing behavioral slope) for male (M_SHAM: $n = 24$), female (F_SHAM: $n = 24$) and gonadectomized mice (M_CAST: $n = 22$; F_OVX: $n = 24$). Significant differences of nociceptive threshold and tolerance are observed between groups (A-B). Some of these differences can also be observed in the percentage of mice reaching the cut-off limit. No significant difference is observed with the analysis of the slope (D). Data are expressed as means \pm SEM. Asterisk indicates statistical differences: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

2.1.3 Alternative nociceptive behavior

Since licking behaviors were observed in few animals, we decided to verify if the use of this behavior as nociceptive threshold (licking or jumping, instead of only the jumping behavior) would change our initial observations (Figure 3). Data were normally distributed and comparisons between means were done using a one-way ANOVA ($p < 0.0001$, $F = 43.02$) with Bonferroni's multiple post-hoc test. As for the jumping behavior, male mice presented lower threshold compared to female mice (M_SHAM: 5.2 ± 0.3 min vs. F_SHAM: 7.8 ± 0.4 min, $p < 0.001$, $t = 6.508$). Gonadectomy was associated with an increase in the threshold values compared to their sham-operated littermates in both females (F_OVX: 9.7 ± 0.2 min vs. F_SHAM: 7.8 ± 0.4 min, $p < 0.001$, $t = 4.497$) and males (M_CAST: 8.5 ± 0.2 min vs. M_SHAM: 5.2 ± 0.3 min, $p < 0.001$, $t = 7.916$). Finally, ovariectomized females showed higher threshold compared to castrated males (F_OVX: 9.7 ± 0.2 min vs. M_CAST: 8.5 ± 0.2 min, $p < 0.05$, $t = 2.735$).

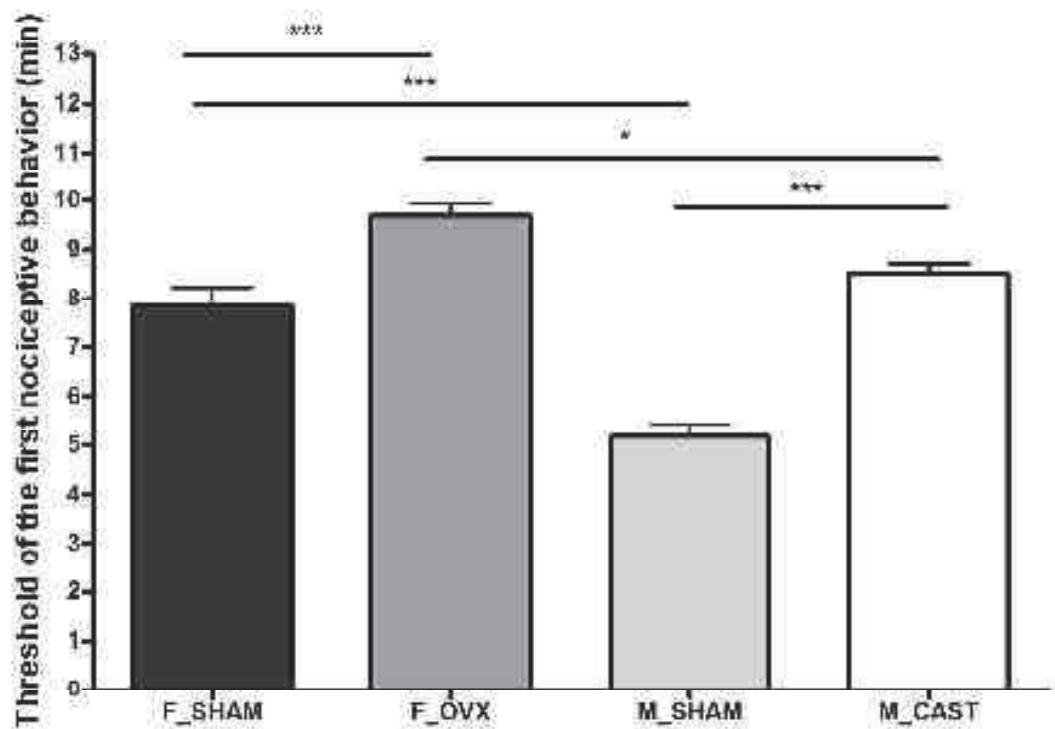


Figure 3

Mean nociceptive threshold (latency in min) to the first nociceptive behavior (licking or jumping behavior) for each animal group: male (M_SHAM: $n = 24$), female (F_SHAM: $n = 24$) and gonadectomized mice (M_CAST: $n = 22$; F_OVX: $n = 24$). Data are expressed as means \pm SEM. Asterisk indicates statistical significance using the following code: *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$

2.1.4 Afferent fibers characterization

In order to understand which type of primary afferent fibers were involved in this nociceptive response, we used capsaicin (CAPS) and DMSO to sensitize C-type and A δ -type fibers, respectively (Treede et al., 1995).

Threshold to jumping behavior was compared between animals receiving a topical application of capsaicin or its vehicle (Figure 4A). Since the same animal was tested one week with the vehicle and the other week with the topical application of capsaicin, Wilcoxon paired test analysis were used (data were not normally distributed). A decreased threshold was observed in every group (F_SHAM: CTRL: 8.1 ± 0.7 min vs. CAPS: 2.0 ± 0.3 min, $p < 0.0001$; F_OVX: CTRL: 10.3 ± 0.4 min vs. CAPS: 4.3 ± 0.7 , $p < 0.0001$; M_SHAM: CTRL: 5.4 ± 0.5 min vs. CAPS: 2.6 ± 0.4 min, $p < 0.01$; M_CAST: 8.5 ± 0.3 min vs. 4.8 ± 0.7 min, $p < 0.004$).

Topical application of DMSO (100%) on the hindpaw allowed us to sensitize afferent A δ -fibers (Treede, 1995). The nociceptive threshold of animals receiving DMSO application or its vehicle was compared (Figure 4B). Since the same animal was tested one week with the vehicle and the other week with the topical application of DMSO, paired t-test analysis were used (data were normally distributed). A decreased nociceptive threshold was observed in F_OVX (CTRL: 10.6 ± 0.3 min vs DMSO: 9.2 ± 0.7 min, $p < 0.05$), M_SHAM (CTRL: 5.5 ± 0.2 min vs. DMSO: 4.1 ± 0.6 min, $p < 0.05$) and M_CAST (CTRL: 8.6 ± 0.3 min vs. DMSO: 7.8 ± 0.5 min, $p < 0.05$) groups (Figure 4B).

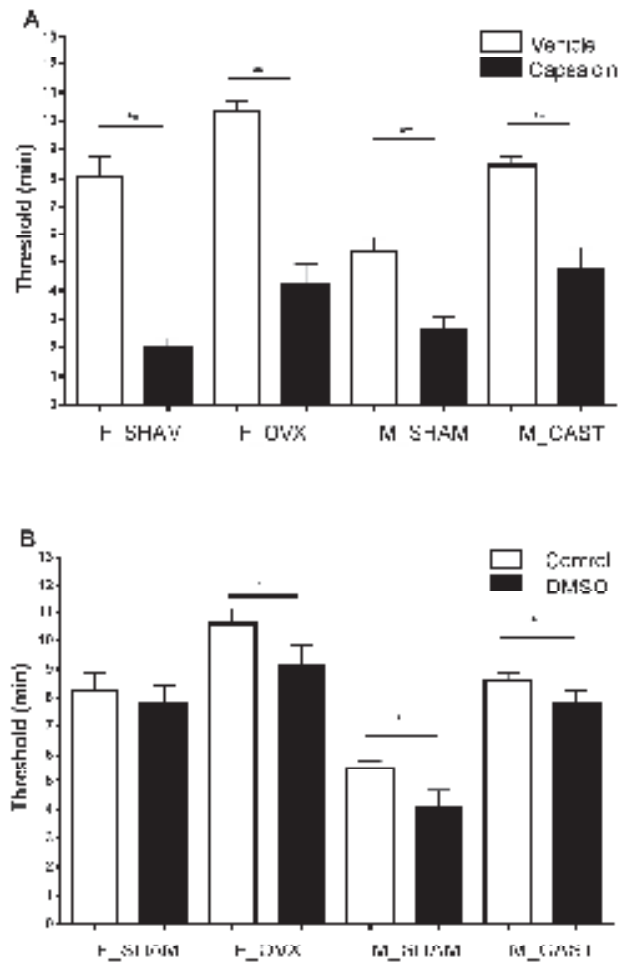


Figure 4

A: Mean threshold for male (M_SHAM: $n = 12$), female (F_SHAM: $n = 12$), and gonadectomized mice (F_OVX: $n = 12$; M_CAST: $n = 11$) after topical application of capsaicin or its vehicle on the plantar surface of the hindpaws. In every case, application of capsaicin decreased the nociceptive threshold. B: Mean nociceptive threshold latencies before and after a topical application of DMSO (100%) in intact (F_SHAM: $n = 12$; M_SHAM: $n = 12$) and gonadectomized mice (F_OVX: $n = 12$; M_CAST: $n = 11$). DMSO application decreased the nociceptive threshold, except for F_SHAM. Asterisk indicates statistical significance: *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$. All data are expressed as means \pm SEM.

2.1.5 Implication of $3\alpha5\alpha$ neuroactive steroids

We next evaluated the influence of $3\alpha5\alpha$ NS on nociceptive response (jumping behavior). In animal treated only with the vehicle, we first compared the latency (in minute) to the first nociceptive behavior (threshold), the tolerance (the latency to reach the cut-off limit, in minutes), the percentage of mice who reach the cut-off limit and, the slope of the curve. As observed before, male nociceptive response appeared earlier compared to female mice or to castrated male mice (Figure 1A, One-way ANOVA, M_SHAM 6.4 ± 0.2 min vs. F_SHAM 9.1 ± 0.3 min, $p < 0.0001$; M_SHAM 6.4 ± 0.2 min vs. M_CAST 8.6 ± 0.3 min, $p < 0.01$). In addition, they reached the cut-off limit earlier (Figure 1B, One-way ANOVA, M_SHAM 7.3 ± 0.2 min vs. F_SHAM 10.6 ± 0.3 min, $p < 0.0001$; M_SHAM 7.3 ± 0.2 min vs. M_CAST 10.4 ± 0.6 min, $p < 0.01$). No significant difference was observed for the percentage of mice reaching the cut-off limit (Figure 1C, Chi-Square test, $p > 0.05$) or the number of jumps per minutes (slope) (Figure 1D, One-way ANOVA, $p > 0.05$).

The next step was to evaluate how these behaviors were modulated by an inhibitor of 3α -hydroxysteroid dehydrogenase (3α -HSD). Following a provera treatment, the threshold was decreased in SHAM and gonadectomized male mice (Figure 6A, Student-*t* test, M_SHAM_VEH 6.4 ± 0.2 min vs. M_SHAM_PRO 5.4 ± 0.3 min, $p < 0.05$; M_CAST_VEH 8.6 ± 0.3 min vs. M_CAST_PRO 7.1 ± 0.4 min, $p < 0.05$). However, a decrease of the latency to reach the cut-off limit was only observed in gonadectomised male (Figure 6B, Student-*t* test, M_CAST_VEH 10.4 ± 0.6 min vs. M_CAST_PRO 8.5 ± 0.4 min, $p < 0.05$). No influence of provera treatment was measured on percentage of mice who reached the cut-off limit (Figure 6C, Fisher's exact test, $p > 0.05$) neither on the slope (Figure 6D, Fisher's exact test, $p > 0.05$).

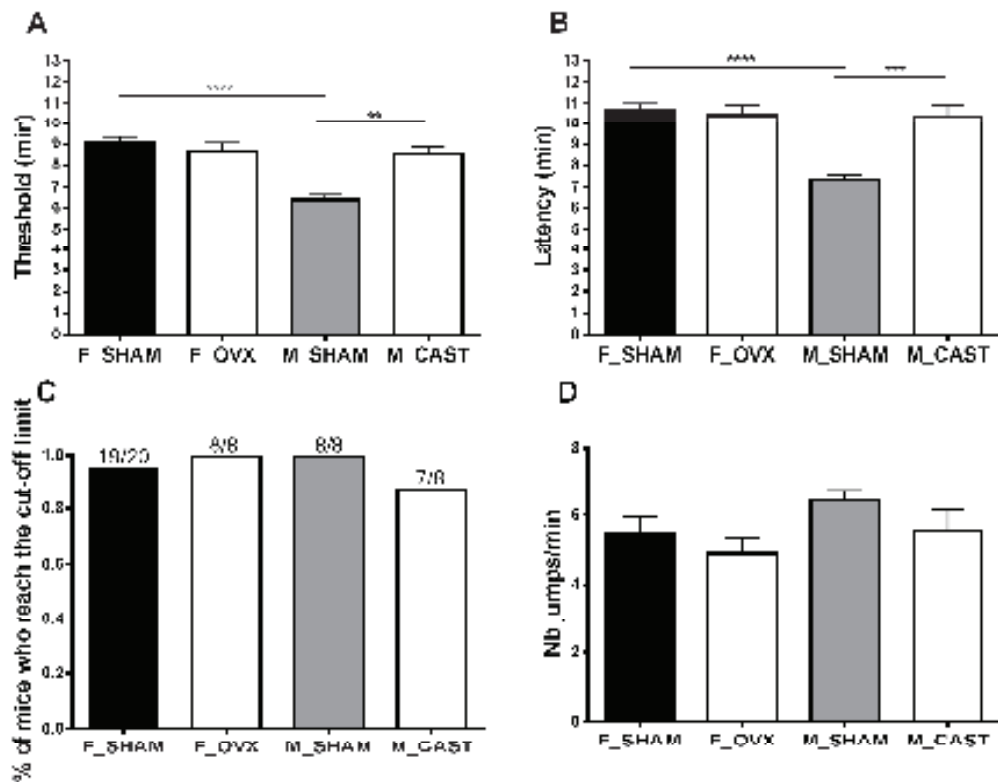


Figure 5

Histograms illustrating the mean nociceptive threshold (A), latency to the maximal nociceptive response allowed (B), percentage of mice who reach the maximal response (C) and latency between the first jump and the maximal response (D) for vehicle-treated male (M_SHAM: $n = 8$), female (F_SHAM: $n = 20$) and gonadectomized mice (M_CAST: $n = 7$; F_OVX: $n = 8$). Significant differences of nociceptive threshold and tolerance are observed between groups (A-B). No significant difference is observed in the percentage of mice reaching the cut-off limit (C) and with the latency between the first jump and the maximal response (D). Data are expressed as means \pm SEM. Asterisk indicates statistical differences: **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ***: $p < 0.001$.

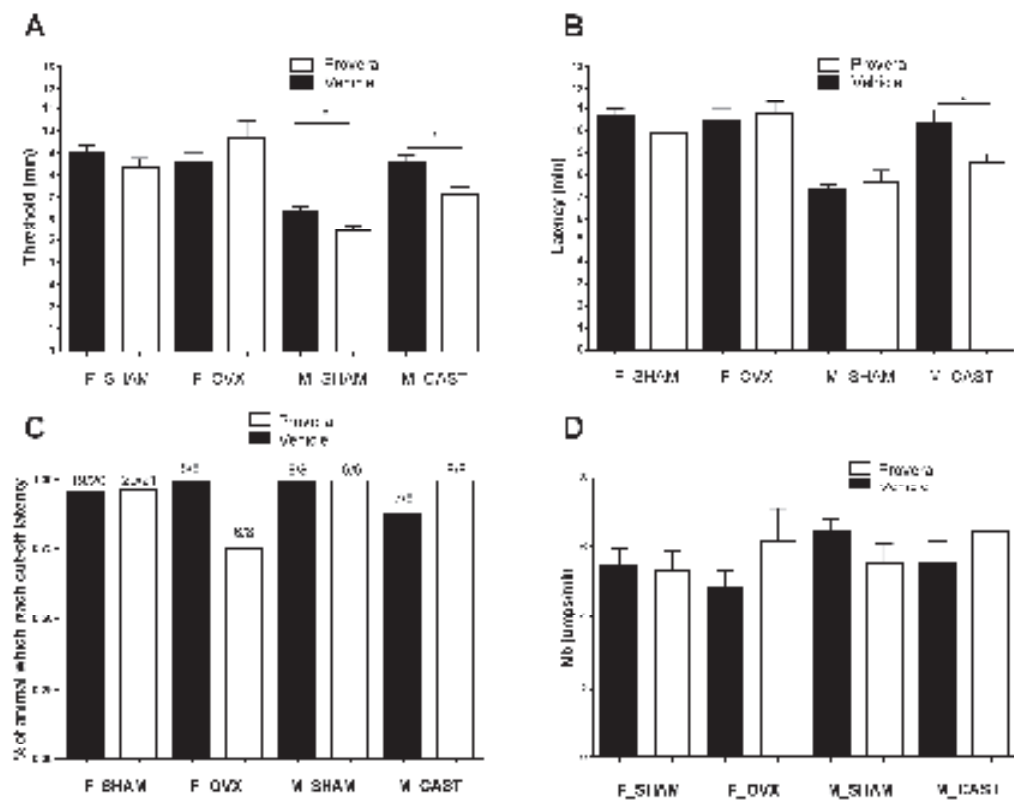


Figure 6

Histograms illustrating the mean nociceptive threshold (A), latency to the maximal nociceptive response allowed (B), percentage of mice reaching the maximal response (C) and latency between the first jump and the maximal response (C) for vehicle-treated and provera-treated male (Vehicle: $n = 8$; Provera $n = 8$), female (Vehicle: $n = 20$; Provera: $n = 21$) and gonadectomized mice (M_CAST_Vehicle: $n = 7$; M_CAST_Provera: $n = 9$; F_OVX_Vehicle: $n = 8$; F_OVX_Provera: $n = 8$). Significant differences of nociceptive threshold and tolerance are observed between vehicle-treated and provera-treated groups (A-B). No significant differences were observed in the percentage of mice who have reached the cut-off limit (C) and the latency between the first jump and the maximal response (D). Data are expressed as means \pm SEM. Asterisk indicates statistical differences: *: $p < 0.05$.

2.2 Formalin test

In order to transpose these last results to another pain model, we compared vehicle-treated mice to provera-treated mice during a formalin test. No differences of nociceptive responses were observed using two-way ANOVA in any groups. However, castrated male mice treated with provera showed an increase of nociceptive behavior during the first phase of the formalin test. We then compared the mean nociceptive score and the mean licking behavior expressed between 0-6 minutes of the test. Provera-treated mice were compared to vehicle-treated mice using a non-parametric Mann-Whitney test. In both case provera-treated animals showed a significantly greater nociceptive responses compared to vehicle-treated one during this first phase of the formalin test (Evaluation of the nociceptive score: M_CAST_Vehicle 1.9 ± 0.1 vs. M_CAST_Provera 2.39 ± 0.08 , $p = 0.008$; Evaluation of the licking behavior: M_CAST_Vehicle 130 ± 25 sec vs. M_CAST_Provera 225 ± 15 sec, $p = 0.008$).

3. Discussion

The aim of this study was to evaluate the role of sex differences on pain response evoked by a slow ramp thermal stimulation using the dynamic hot plate (DHP) test in mice. Since it is well established that male and female often exhibit different responses to nociceptive stimulus, it is of interest to determine if this method is suitable to reveal sex differences in pain expression. In this study, female mice showed a higher threshold and, a higher tolerance compared to male mice. These results were quite surprising. In fact, females generally show lower thresholds than males (Fillingim et al., 2009; Kuba et al., 2005). However, Leo et al. (2008) showed that sex differences in mice are highly dependent of the type of the behavioral test chosen. Surprisingly, we observed greater nociceptive responses in male mice compared to their female counterparts. Gonadectomized animals from both sexes had higher nociceptive thresholds compared to sham-operated mice. $3\alpha 5\alpha$ NS does not seem to have an important influence on nociceptive behavior associated with the DHP. Interestingly, provera had a hyperalgesic effect on nociceptive threshold in castrated or sham-castrated male mice. These results in castrated male mice were replicated in a formalin pain model.

Several factors could be involved in the perception of a thermal stimulus and the nociceptive response associated. First, skin thickness has been described as an important parameter to consider in thermal nociception assay (Tjolsen et al., 1991). It is highly involved in heat transmission and in the speed of nociceptor activation (LeBars et al., 2001; Tjolsen et al., 1991). It has been shown that male have thicker skin compared to female mice and it seems to be hormono-dependent (Azzi et al., 2005). Thicker skin could easily be associated with a longer diffusion rate and an increased reaction time (Tjolsen et al., 1991). However, the response observed was happening faster in male, which exclude this factor. On the other hand, the microcirculation of the skin is an important determinant of pain transmission (LeBars et al., 2001). It is known that, in situation of external heating, vasoconstriction decrease the skin cooling whereas vasodilatation will facilitate the dissipation of heat

(LeBars et al., 2001). The involvement of sex steroids on microcirculation could explain part of our results. The binding of estrogen to its α -type receptors is known to produce an increase of NO synthesis and release from the endothelium (Suzuki et al., 2003). This action of NO, by increasing vasodilatation, could influence the heating diffusion through the skin and the paw and increase the latency to a thermal nociceptive stimulus (LeBars et al., 2001). Testosterone and DHEA also possess vasodilatory properties (Suzuki et al., 2003). In counterpart, skin perfusion and temperature are lower in females compared to males (Cooke et al., 1990; Vierck et al., 2008). Finally, Vierck et al. (2008) have also suggested a preference of female animals for heat, whereas males seem to prefer cold temperature. This observation illustrates the difficulty to really compare basal thermal nociceptive threshold between sexes, which are determined by numerous environmental and intrinsic factors.

To determine which type of afferent fiber was primarily involved in this nociception model, and to better characterize sex differences, capsaicin and DMSO topical applications were used to sensitize C-type and A δ -type afferent fibers, respectively (Tzabazis et al., 2005). Capsaicin, extracted from hot chilli peppers, is often used in experimental pain studies to selectively activate C fibers (Caterina et al., 1997). Capsaicin is a TRPV1 receptor-channel agonist producing excitation of a subset of C-fibers projecting to the spinal cord (Caterina et al., 1997), it can be injected or topically applied. While low concentrations of capsaicin topically applied (10 mM) sensitize C-fibers, high capsaicin concentrations (150 mM) desensitize C-fibers (McMullan et al., 2004; Tzabazis et al., 2005). Topic application or injection of capsaicin induces a dose and time dependant hyperalgesia. It has been observed in human and in animal studies that females are more sensitive to capsaicin than males (Barrett et al., 2003; Fillingim et al., 2009). In agreement with these observations, our results suggest a greater sensitization of C-fibers in females compared to males (percentage of the baseline, student t test, F_SHAM: 27 ± 5 % vs. M_SHAM: 47 ± 6 , $p = 0.0161$). In addition, a slight involvement of A δ -fibers has been noted. However,

the results obtained have not shown any specific effect of gonadal hormones on capsaicin sensitization. These results are not completely in accordance with previous results (Yalcin et al., 2009; Yeomans et al., 1996; Yeomans and Proudfit, 1996). Since the heating slope is very slow, we could have expected a specific activation of C-fibers (Yeomans et al., 1996; Yeomans and Proudfit, 1996). Furthermore, Yalcin et al. (2009) confirmed this hypothesis and did not observe any influence of DMSO sensitization of A δ -fibers. Nevertheless, the influence of DMSO application is particularly small. We observed 7-27% reduction of nociceptive behavior with the topical application of DMSO, compared to 53-73% effect of capsaicin application.

It is well known that sex steroid act on their nuclear receptor to alter gene expression throughout the body (McEwen, 1991). However, the rapid action of neuroactive steroids on membrane receptors of the peripheral and central nervous system is also described. The allosteric modulation of GABA_A receptor by neuroactive steroids, particularly 3 α 5 α -reduced metabolites, is pointed out in pain modulation (Lambert et al., 2009). Their anti-nociceptive properties have already been shown on several pain models (Aouad et al., 2009; Charlet et al., 2008; Poisbeau et al., 2005). The mechanisms sustaining the sex difference of pain perception is surely a very complex system involving a plethora of neurotransmitters and neuropeptides. Sex steroid hormones, by their binding to nuclear receptor can alter gene expression of receptors, enzyme neuromodulators and, thus, modulate the frail homeostasis of the nervous system (McEwen, 1991). The 6-medroxyprogesterone (MPA, Provera) was used in this experimentation to inhibit 3 α 5 α NS synthesis. Provera is a common synthetic progestin used for post-menopausal hormone replacement therapy and is used as contraceptive in women (Hapgood et al., 2004). It acts on synthesis 3 α 5 α NS by the inhibition of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase (3 α -HSD)(Penning et al., 1985). We used the formalin test as a comparison point. The formalin test is particularly known for its triphasic pain response (Dubuisson and Dennis, 1977; Hunskaar et al., 1985; Sawynok and Liu, 2003). This test specifically allowed the evaluation, within a single experimentation, of pain transmission and

pain inhibition mechanisms (Dubuisson and Dennis, 1977; Gaumond et al., 2002; Henry et al., 1999; Spooner et al., 2007). The first phase of the formalin test represents the acute activation afferent c-fibers nociceptors (Dallel et al., 1995; Sawynok and Liu, 2003; Shibata et al., 1989; Wheeler-Aceto and Cowan, 1991). The interphase, located between the acute and the tonic phases, represents an active inhibition of behavioral and electrophysiological responses to the formalin test driven by both spinal and supraspinal controls (Henry et al., 1999; Matthies and Franklin, 1992). The precise mechanism underlying the interphase is still unknown, but we can acknowledge the involvement of opioid, GABA_A and glutamate receptors in this inhibition (Coderre and Melzack, 1992; Gaumond et al., 2007; Kaneko and Hammond, 1997). Finally, the early and late tonic phase (Spooner et al., 2007) represents an inflammatory process and is inhibited by non-steroidal anti-inflammatory treatment (Hunnskaar et al., 1986b; Hunnskaar and Hole, 1987). Another hypothesis sustained an involvement of central sensitization on the pain response during this phase (Sawynok and Liu, 2003).

Effects of provera on pain perception are not well established. In 1980, a group observed analgesic effect of provera PO in advanced cases of cancer (Pannuti et al., 1980; Sasagawa et al., 1989a; Sasagawa et al., 1989b). The same team have carried out thermal and mechanical nociception test and found no evidence of analgesic effect. However, they found indication for anti-inflammatory properties to this compound (Pannuti et al., 1985).

We measured a hyperalgesic effect of provera in male mice (castrated or sham-castrated). Considering the inhibition of 3 α 5 α NS, which are described as antinociceptive, the increased nociceptive response following provera treatment was expected (Charlet et al., 2008). This effect was observed during the dynamic hot plate test, but also during the first phase of the formalin test (in castrated mice only). In both case, it represents a modulation of acute pain mechanisms. However, no significant effect of provera was observed during the interphase or the second phase

of the formalin test. These results are correlated with previous observations done in male rats receiving finasteride, a 5α -reductase inhibitor. We measured, in these finasteride-treated males, a decreased nociceptive threshold (hyperalgesia) to the calibrated forceps test and an absence of effect during stress-induced analgesia (Coulombe et al., 2011a). This effect, as observed in this experimentation, was more important in castrated male compared to sham-castrated. These results suggest 1) that $3\alpha5\alpha$ NS are not involved equally in pain transmission and descending pain control mechanisms, 2) the effect of $3\alpha5\alpha$ NS on acute thermal pain seems to derive from intrinsic organizational mechanism that is not altered by castration. This organizational effect could be associated with neurotransmitter synthesis, modulation of receptors expression, inhibition or stimulation of enzyme metabolism, compensation by other hormones.

In any case, we should not search for a single explanation for the sex difference observed here. In this type of pain model, it is important to consider the multiple involvements of the nociceptor activation, the afferent fiber transmission, and the supraspinal integration of the pain stimulus. The thermal stimulus produced by the DHP can be seen as an inescapable pain testing paradigm, i.e. a low intensity stimulus on a longer period of time (Lumb, 2002). It has been described that escapable pain and inescapable pain are processed differently in the brain (Lumb, 2002). In fact, it has been described that escapable pain, produced by a brief stimulation, is activating lateral column of periaqueductal gray (PAG, associated with active coping) whereas inescapable pain, produced by a persistent stimulation, is related to the ventrolateral PAG (associated with passive coping) (Lumb, 2002). Moreover, Lumb et al. (2002) have suggested a differential activation of PAG area dependent on the type of nerve fiber involved. Consequently, the long lasting stimulation and the major activation of C-fiber associated with the DHP point us to an inescapable type of pain producing passive coping, *i.e.* quiescence, bradycardia, and hypotension. Interestingly, sex hormones significantly affect PAG areas involved in aversive situation coping (Devall and Lovick, 2010). The difference of nociceptive

behavior observed in this experimentation could thus likely result from a different integration of nociceptive informations at a supraspinal level.

3.1 Conclusion

In conclusion, our DHP testing procedure was particularly efficient to reveal sex-specific differences of thermal nociception in mice. Females responded to higher temperatures compared to males, and their latency to reach the cut-off limit was longer. In both sexes, the use of gonadectomized mice confirmed that sex hormones play a role to regulate thermal nociceptive processes. This was further supported while using the capsaicin model of peripheral sensitization that leads to similar conclusions. An activational effect of gonadal hormones seems present, since gonadectomized animals had higher thresholds and higher latencies compared to sham-gonadectomized mice. Moreover, A δ - and C-fibers contribute to the nociceptive response during the dynamic hot plate. At this stage, we cannot conclude on which mechanisms this sex difference is produced. We can, however, hypothesize that these mechanisms influence the integration of nociceptive messages at every stage of the central nociceptive processing. Further studies will be needed to identify the predominant structures involved in order to unravel the mechanisms underlying these differences. With respect to the type of the pain stimulation, the integration in the cortex, the hypothalamus, or the midbrain might be different (Keay and Bandler, 2002; Lumb, 2002). Differences in the integration circuit could be a lead in the understanding of sex differences observed in this study considering the use of an inescapable type of pain compared to standard hot plate, which involved mostly an escapable type of pain.

4. Experimental procedure

4.1 Animals

All mice C57Bl/6j (Janvier, Le Genest St Isle, France) were kept in groups of 4 to 5 per cage. They were of the same sex and lived in an animal house facility under a 12-hour light/dark cycle, a regulated temperature and hygrometry (20°C, 55%), with *ad libitum* access to food and water. All experimentations were performed on adult mice, 16-19 weeks of age, between 08:00 and 16:00. Male (M) and female (F) mice were divided into 4 groups: male and female sham-operated (M_SHAM and F_SHAM), castrated male (M_CAST) and ovariectomized female (F_OVX).

This study was conducted in accordance with European Union Directive 2010/63/EU (September 22, 2010) on the use of animals in research. All procedures have been realized in authorized facilities under the responsibility of an officially-recognized principal investigator (license n° 67-116 to PP from French ministry of agriculture). Procedures were submitted, evaluated and approved by the regional ethic committee for animal experimentation (AL/01/20/12/09).

4.2 Gonadectomy

Male and female C57BL/6j mice were bilaterally gonadectomized 10 weeks after birth (2 weeks after their arrival) under ketamine/xylazine (87 mg/kg, 13 mg/kg, IP) using standard surgical procedures (Coulombe et al., 2011b). For both sexes, a control group of mice was sham-operated as described earlier (Coulombe et al., 2011b). Mice were allowed to recover for 5 weeks after gonadectomy. During that period, the animals were observed and weighted weekly. Animals were habituated to manipulation and to the experimental apparatus one week before the testing day.

4.3 Dynamic hot-plate test (DHP) test

Animals were placed on a DHP (Bioseb, France) at a fixed temperature of 30 ± 0.1°C for 15 minutes in order to get them habituated to the testing apparatus. After

this period, without further manipulation of the animal, the plate temperature increases at a speed of 2°C/min to a maximal value of 46°C. This procedure was immediately stopped if 10 jumps were observed in a block of 30 seconds (cut-off limit) to minimize animal suffering. If possible, the temperature of 46°C was maintained for a maximum duration of 5 minutes (cut-off latency) and this had no consequence on tissue integrity of the tested mice. During each degree interval, we scored escape behaviors (jumps) of mice. The presence or absence of licking behavior, the number of feces produced during the habituation and the testing period, the presence of jumping behavior during the habituation period, the gain or loss of weight during the period between surgery and testing, or any physical particularities were noted as observations.

4.4 Peripheral sensitization

Peripheral sensitization was triggered by topical application of capsaicin (10 mM, 50% ethanol:saline, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) or dimethyl sulfoxide (DMSO, 100%, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France), with a Q-tip, on the plantar surface of both hindpaws of mice. Each drug application had its own control group, *i.e.* 50% ethanol:saline for capsaicin and saline 0.9% for DMSO. Jumping behaviors were observed during the habituation period of animal who received capsaicin (15 min, 30°C) in 50% of F_OVX, 89% of F_SHAM, 60% of M_CAST and 100% of M_SHAM mice ($p = 0.028$).

Each mouse received the four conditions (50% saline:ethanol, capsaicin, saline, DMSO) in four consecutive weeks. A week of rest was allowed between each experiment to reduce the adaptation or sensitization associated with the dynamic hot plate. Control situations were always done before experimental ones but the order of treatment (capsaicin or DMSO) was randomized. In a cage housing five mice, two mice began with the capsaicin treatment (control and then capsaicin), two mice began with the DMSO treatment (control and then DMSO) and one mouse had no treatment, only repeated experiments.

4.5 Inhibition of 3 α 5 α -reduced metabolites

Provera treatment has been used to inhibit the synthesis of 3 α 5 α NS by the inhibition of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase (3 α -HSD)) (Belelli and Herd, 2003; Penning et al., 1985). Mice were pretreated with provera (20 mg/kg, in olive oil, SC, 150 μ L/25g), four times in a period of 7 days (on even days, and on the day of experimentation, one hour before the beginning of the testing). Vehicle treated mice received only olive oil 150 μ L/25g, SC, on a similar scheme of injection.

4.6 Formalin test

The formalin test was used in order to compare our results with a well-known nociceptive test. The mice were acclimatized to manipulations and to testing apparatus in order to reduce the stress induced by the environment (15 min every day, over 5 days) (Capone and Aloisi, 2004; Saddi and Abbott, 2000). All procedures were performed on adult mice, 15-16 weeks of age, between 09:00 and 12:00 AM to reduce any variation related to circadian rhythm.

Mice received a subcutaneous injection of 20 μ L of 5.2% formalin (2% of formaldehyde) into the plantar surface of the right hind paw. Immediately after the formalin injection, the mice was placed in a Plexiglas box (30 x 30 x 30 cm) surrounded by mirrors to allow observation of nociceptive responses. Animal tested were of the same sex and were not allowed to see each other (Langford et al., 2006). Mice were video-taped, one per box, 8 mice at the same time, for 1h and the behaviors were noted using a home-developed data-processing program (Gaumond et al., 2002). As previously described by Dubuisson & Dennis (1977) we weighted the time spent in each of four behavioural categories:

- 0 the injected paw is completely on the ground;
- 1 the injected paw has little or no weight placed on it;
- 2 the injected paw is raised;
- 3 the injected paw is licked or bitten.

The measurement of behaviors was divided in four phases (Coulombe et al., 2011b) (phase 1: 0-6 min, interphase 9-18 min, phase 2a: 21-39 min and phase 2b: 42-60 min) and analyzed as four different events (Coulombe et al., 2011b). Video analysis was done entirely by Coulombe MA. Statistical analysis compared the time spent in licking behavior for each phases of the formalin test between each group.

4.7 Data Analysis

In all experiments, Gaussian distribution and normality of the data's distribution were evaluated by the Shapiro-Wilk normality test. Mean comparisons were calculated using ANOVA or Kruskal-Wallis test (when data were not normally distributed) and Bonferroni post-hoc test for selected pairs or Dunns post-hoc test for selected pairs (when data were not normally distributed).

For the experimentation using topical application of capsaicin (CAPS) or DMSO, the variation of pain threshold between control groups (CTRL) vs CAPS/DMSO condition was determined by a two-tailed paired student-t test when data were normally distributed, and by a two-tailed Wilcoxon ranked signed test for matched pairs when data were not normally distributed.

Acknowledgments

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Institut Universitaire de France. MA Coulombe holds a doctoral research award from the Canadian Institute of Health Research (CIHR). Dr Marchand is a supported member of the Centre de recherche clinique Étienne-Le Bel of the Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke. Dr Marchand holds grants from the CIHR.

References

- Aloisi, A.M., Ceccarelli, I., Fiorenzani, P., 2003. Gonadectomy affects hormonal and behavioral responses to repetitive nociceptive stimulation in male rats. *Ann N Y Acad Sci.* 1007, 232-237.
- Aloisi, A.M., Bonifazi, M., 2006. Sex hormones, central nervous system and pain. *Horm Behav.* 50, 1-7.
- Aouad, M., Charlet, A., Rodeau, J.-L., Poisbeau, P., 2009. Reduction and prevention of vincristine-induced neuropathic pain symptoms by the non-benzodiazepine anxiolytic etifoxine are mediated by 3alpha-reduced neurosteroids. *Pain.* 147, 54-59.
- Azzi, L., El-Alfy, M., Martel, C., Labrie, F., 2005. Gender differences in mouse skin morphology and specific effects of sex steroids and dehydroepiandrosterone. *J Invest Dermatol.* 124, 22-27.
- Barrett, A.C., Smith, E.S., Picker, M.J., 2003. Capsaicin-induced hyperalgesia and mu-opioid-induced antihyperalgesia in male and female Fischer 344 rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 307, 237-245.
- Belelli, D., Herd, M.B., 2003. The contraceptive agent Provera enhances GABA(A) receptor-mediated inhibitory neurotransmission in the rat hippocampus: evidence for endogenous neurosteroids? *J Neurosci.* 23, 10013-10020.
- Bethea, C.L., Lu, N.Z., Gundlach, C., Streicher, J.M., 2002. Diverse actions of ovarian steroids in the serotonin neural system. *Front Neuroendocrinol.* 23, 41-100.
- Borzan, J., Fuchs, P.N., 2006. Organizational and activational effects of testosterone on carrageenan-induced inflammatory pain and morphine analgesia. *Neuroscience.* 143, 885-893.
- Capone, F., Aloisi, A.M., 2004. Refinement of pain evaluation techniques. The formalin test. *Ann Ist Super Sanita.* 40, 223-229.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D., 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 389, 816-824.
- Charlet, A., Lasbennes, F., Darbon, P., Poisbeau, P., 2008. Fast non-genomic effects of progesterone-derived neurosteroids on nociceptive thresholds and pain symptoms. *Pain.* 139, 603-609.
- Coderre, T.J., Melzack, R., 1992. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J Neurosci.* 12, 3665-3670.
- Cooke, J.P., Creager, M.A., Osmundson, P.J., Shepherd, J.T., 1990. Sex differences in control of cutaneous blood flow. *Circulation.* 82, 1607-1615.
- Coulombe, M.A., Marchand, S., Poisbeau, P., 2011a. Relationship between gonadal steroids and neurosteroids in modulation of stress-induced analgesia. In 6th International Meeting: Steroids and Nervous System. Vol., G.C. Panzica, S. Gotti, ed.ed.s., Torino, Italy.
- Coulombe, M.A., Spooner, M.F., Gaumond, I., Carrier, J.C., Marchand, S., 2011b. Estrogen receptors beta and alpha have specific pro- and anti-nociceptive actions. *Neuroscience.* 184, 172-182.

- Cyr, M., Ghribi, O., Di Paolo, T., 2000a. Regional and selective effects of oestradiol and progesterone on NMDA and AMPA receptors in the rat brain. *J Neuroendocrinol.* 12, 445-452.
- Cyr, M., Landry, M., Di Paolo, T., 2000b. Modulation by estrogen-receptor directed drugs of 5-hydroxytryptamine-2A receptors in rat brain. *Neuropsychopharmacology.* 23, 69-78.
- D'Souza, D.N., Harlan, R.E., Garcia, M.M., 2003. Modulation of glutamate receptor expression by gonadal steroid hormones in the rat striatum. *Brain Res Bull.* 59, 289-292.
- Dallel, R., Raboisson, P., Clavelou, P., Saade, M., Woda, A., 1995. Evidence for a peripheral origin of the tonic nociceptive response to subcutaneous formalin. *Pain.* 61, 11-16.
- Devall, A.J., Lovick, T.A., 2010. Differential activation of the periaqueductal gray by mild anxiogenic stress at different stages of the estrous cycle in female rats. *Neuropsychopharmacology.* 35, 1174-1185.
- Dubuisson, D., Dennis, S.G., 1977. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain.* 4, 161-174.
- Duclaux, R., Kenshalo, D.R., 1980. Response characteristics of cutaneous warm receptors in the monkey. *J Neurophysiol.* 43, 1-15.
- Fillingim, R.B., King, C.D., Ribeiro-Dasilva, M.C., Rahim-Williams, B., Riley, J.L., 3rd, 2009. Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. *J Pain.* 10, 447-485.
- Gaumond, I., Arsenault, P., Marchand, S., 2002. The role of sex hormones on formalin-induced nociceptive responses. *Brain Res.* 958, 139-145.
- Gaumond, I., Spooner, M.F., Marchand, S., 2007. Sex differences in opioid-mediated pain inhibitory mechanisms during the interphase in the formalin test. *Neuroscience.* 146, 366-374.
- Hapgood, J.P., Koubovec, D., Louw, A., Africander, D., 2004. Not all progestins are the same: implications for usage. *Trends Pharmacol Sci.* 25, 554-557.
- Henry, J.L., Yashpal, K., Pitcher, G.M., Coderre, T.J., 1999. Physiological evidence that the 'interphase' in the formalin test is due to active inhibition. *Pain.* 82, 57-63.
- Hunskar, S., Fasmer, O.B., Hole, K., 1985. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J Neurosci Methods.* 14, 69-76.
- Hunskar, S., Berge, O.G., Hole, K., 1986a. A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics. *Behav Brain Res.* 21, 101-108.
- Hunskar, S., Berge, O.G., Hole, K., 1986b. Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. *Pain.* 25, 125-132.
- Hunskar, S., Hole, K., 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain.* 30, 103-114.
- Kaneko, M., Hammond, D.L., 1997. Role of spinal gamma-aminobutyric acidA receptors in formalin-induced nociception in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 282, 928-938.

- Keay, K.A., Bandler, R., 2002. Distinct central representations of inescapable and escapable pain: observations and speculation. *Exp Physiol.* 87, 275-279.
- Kuba, T., Kemen, L.M., Quinones-Jenab, V., 2005. Estradiol administration mediates the inflammatory response to formalin in female rats. *Brain Res.* 1047, 119-122.
- Kuba, T., Quinones-Jenab, V., 2005. The role of female gonadal hormones in behavioral sex differences in persistent and chronic pain: clinical versus preclinical studies. *Brain Res Bull.* 66, 179-188.
- Lacroix-Fralish, M.L., Tawfik, V.L., Nutile-McMenemy, N., Deleo, J.A., 2008. Neuregulin 1 is a pronociceptive cytokine that is regulated by progesterone in the spinal cord: implications for sex specific pain modulation. *Eur J Pain.* 12, 94-103.
- Lambert, J.J., Cooper, M.A., Simmons, R.D.J., Weir, C.J., Belevi, D., 2009. Neurosteroids: endogenous allosteric modulators of GABA(A) receptors. *Psychoneuroendocrinology.* 34 Suppl, S48-S58.
- LaMotte, R.H., Campbell, J.N., 1978. Comparison of responses of warm and nociceptive C-fiber afferents in monkey with human judgments of thermal pain. *J Neurophysiol.* 41, 509-528.
- Langford, D.J., Cragger, S.E., Shehzad, Z., Smith, S.B., Sotocinal, S.G., Levenstadt, J.S., Chanda, M.L., Levitin, D.J., Mogil, J.S., 2006. Social modulation of pain as evidence for empathy in mice. *Science.* 312, 1967-1970.
- LeBars, D., Gozariu, M., Cadden, S.W., 2001. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev.* 53, 597-652.
- Leo, S., Straetemans, R., D'Hooge, R., Meert, T., 2008. Differences in nociceptive behavioral performance between C57BL/6J, 129S6/SvEv, B6 129 F1 and NMRI mice. *Behav Brain Res.* 190, 233-242.
- Loyd, D.R., Murphy, A.Z., 2008. Androgen and estrogen (alpha) receptor localization on periaqueductal gray neurons projecting to the rostral ventromedial medulla in the male and female rat. *J Chem Neuroanat.* 36, 216-226.
- Lumb, B.M., 2002. Inescapable and escapable pain is represented in distinct hypothalamic-midbrain circuits: specific roles for Delta- and C-nociceptors. *Exp Physiol.* 87, 281-286.
- Matthies, B.K., Franklin, K.B., 1992. Formalin pain is expressed in decerebrate rats but not attenuated by morphine. *Pain.* 51, 199-206.
- McEwen, B.S., 1991. Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends Pharmacol Sci.* 12, 141-147.
- McEwen, B.S., Coirini, H., Westlind-Danielsson, A., Frankfurt, M., Gould, E., Schumacher, M., Woolley, C., 1991. Steroid hormones as mediators of neural plasticity. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 39, 223-232.
- McEwen, B.S., 2001. Invited review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *J Appl Physiol.* 91, 2785-2801.
- McMullan, S., Simpson, D.A.A., Lumb, B.M., 2004. A reliable method for the preferential activation of C- or A-fibre heat nociceptors. *J Neurosci Methods.* 138, 133-139.

- Moggs, J.G., Orphanides, G., 2001. Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses. *EMBO Rep.* 2, 775-781.
- Pannuti, F., Burrioni, P., Fruet, F., Piana, E., Strocchi, E., Marco, A.R.D., Cricca, A., Camaggi, C.M., 1980. Anabolizing and anti-pain effect of the short-term treatment with medroxyprogesterone acetate (MAP) at high oral doses in oncology. *Panminerva Med.* 22, 149-156.
- Pannuti, F., Martoni, A., Murari, G., De Sanctis, R., Fruet, F., Strocchi, E., 1985. Analgesic activity of medroxyprogesterone acetate (MAP) in cancer patients: an antiinflammatory mediated activity? *Int J Tissue React.* 7, 505-508.
- Penning, T.M., Sharp, R.B., Krieger, N.R., 1985. Purification and properties of 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase from rat brain cytosol. Inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and progestins. *J Biol Chem.* 260, 15266-15272.
- Pfaff, D.W., Vasudevan, N., Kia, H.K., Zhu, Y.S., Chan, J., Garey, J., Morgan, M., Ogawa, S., 2000. Estrogens, brain and behavior: studies in fundamental neurobiology and observations related to women's health. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 74, 365-373.
- Poisbeau, P., Patte-Mensah, C., Keller, A.F., Barrot, M., Breton, J.D., Luis-Delgado, O.E., Freund-Mercier, M.J., Mensah-Nyagan, A.G., Schlichter, R., 2005. Inflammatory pain upregulates spinal inhibition via endogenous neurosteroid production. *J Neurosci.* 25, 11768-11776.
- Rupprecht, R., 2003. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. *Psychoneuroendocrinology.* 28, 139-168.
- Saddi, G., Abbott, F.V., 2000. The formalin test in the mouse: a parametric analysis of scoring properties. *Pain.* 89, 53-63.
- Sasagawa, I., Satomi, S., Katayama, T., 1989a. [Remarkable pain relief in the treatment with high-dose medroxyprogesterone acetate in advanced prostatic carcinoma]. *Gan No Rinsho.* 35, 767-71.
- Sasagawa, I., Satomi, S., Umeda, K., Katayama, T., 1989b. [Pain relief by high-dose medroxyprogesterone acetate in advanced prostatic cancer]. *Hinyokika Kiyo.* 35, 603-608.
- Sawynok, J., Liu, X.J., 2003. The Formalin Test: Characteristics and Usefulness of the Model. *Reviews in Analgesia.* 7, 145-163.
- Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., Inoki, R., 1989. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain.* 38, 347-352.
- Simoncini, T., Genazzani, A.R., 2003. Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol.* 148, 281-292.
- Smith, S.S., Waterhouse, B.D., Woodward, D.J., 1988. Locally applied estrogens potentiate glutamate-evoked excitation of cerebellar Purkinje cells. *Brain Res.* 475, 272-282.
- Spooner, M.F., Robichaud, P., Carrier, J.C., Marchand, S., 2007. Endogenous pain modulation during the formalin test in estrogen receptor beta knockout mice. *Neuroscience.* 150, 675-680.

- Suzuki, T., Nakamura, Y., Moriya, T., Sasano, H., 2003. Effects of steroid hormones on vascular functions. *Microsc Res Tech.* 60, 76-84.
- Tillman, D.B., Treede, R.D., Meyer, R.A., Campbell, J.N., 1995. Response of C fibre nociceptors in the anaesthetized monkey to heat stimuli: estimates of receptor depth and threshold. *J Physiol.* 485, 753-765.
- Tjolsen, A., Rosland, J.H., Berge, O.G., Hole, K., 1991. The increasing-temperature hot-plate test: an improved test of nociception in mice and rats. *J Pharmacol Methods.* 25, 241-250.
- Treede, R.D., 1995. Peripheral acute pain mechanisms. *Ann Med.* 27, 213-216.
- Treede, R.D., Meyer, R.A., Raja, S.N., Campbell, J.N., 1995. Evidence for two different heat transduction mechanisms in nociceptive primary afferents innervating monkey skin. *J Physiol.* 483, 747-758.
- Truss, M., Beato, M., 1993. Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr Rev.* 14, 459-479.
- Tzabazis, A., Klyukinov, M., Manering, N., Nemenov, M.I., Shafer, S.L., Yeomans, D.C., 2005. Differential activation of trigeminal C or Adelta nociceptors by infrared diode laser in rats: behavioral evidence. *Brain Res.* 1037, 148-156.
- Vierck, C.J., Acosta-Rua, A.J., Rossi, H.L., Neubert, J.K., 2008. Sex differences in thermal pain sensitivity and sympathetic reactivity for two strains of rat. *J Pain.* 9, 739-749.
- Wall, P.D., McMahon, S.B., Koltzenburg, M.U.h.b.g.c.b.i.b., 2006. *Textbook of Pain.* Vol., Elsevier Science Health Science Division.
- Wheeler-Aceto, H., Cowan, A., 1991. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology (Berl).* 104, 35-44.
- Wilson, S.G., Mogil, J.S., 2001. Measuring pain in the (knockout) mouse: big challenges in a small mammal. *Behav Brain Res.* 125, 65-73.
- Yalcin, I., Charlet, A., Freund-Mercier, M.-J., Barrot, M., Poisbeau, P., 2009. Differentiating thermal allodynia and hyperalgesia using dynamic hot and cold plate in rodents. *J Pain.* 10, 767-773.
- Yeomans, D.C., Pirec, V., Proudfit, H.K., 1996. Nociceptive responses to high and low rates of noxious cutaneous heating are mediated by different nociceptors in the rat: behavioral evidence. *Pain.* 68, 133-140.
- Yeomans, D.C., Proudfit, H.K., 1996. Nociceptive responses to high and low rates of noxious cutaneous heating are mediated by different nociceptors in the rat: electrophysiological evidence. *Pain.* 68, 141-150.

ARTICLE 3

The role of gonadal hormones and neurosteroids in the modulation of swim-stress induced analgesia in rats

Auteurs de l'article: Marie-Andrée Coulombe, Isabelle Gaumont, Vincent Lelièvre, Pierrick Poisbeau, Serge Marchand

Statut de l'article: soumis à *Plos One* 6 juin 2013

Avant-propos: J'ai participé activement à toutes les étapes de ce projet de recherche, que ce soit l'écriture du protocole, les soumissions éthiques, les chirurgies, les expérimentations comportementales, le prélèvement des tissus, l'analyse des données et l'écriture du manuscrit. L'expression génique des sous-unités du récepteur GABA_A et des cotransporteurs NKCC1 et KCC2 a été mesurée par Pr Lelièvre. Les différents coauteurs m'ont particulièrement aidé en révisant et corrigeant le manuscrit final.

Résumé : L'implication des hormones gonadiques dans les mécanismes de modulation de la douleur a été démontrée dans le passé (Gaumont *et al.*, 2002, 2005). L'objectif de cette étude était de déterminer l'implication des métabolites 5 α -réduits dans les mécanismes de modulation de la douleur. Lors de cette expérimentation, l'effet des stéroïdes gonadiques sur l'amplitude de l'analgésie induite par le stress (AIS) a été évalué chez des animaux recevant du finasteride, un inhibiteur de la 5 α -réductase, ou le véhicule. Dans un premier temps, les résultats ont démontré une amplitude d'analgésie beaucoup plus élevée chez les rats mâles en comparaison des femelles, de même que la variation d'analgésie chez les animaux gonadectomisés. Dans un second temps, l'injection de finasteride, n'a produit aucun effet sur l'analgésie induite par le stress chez les différents groupes d'animaux. Par contre, les mâles, sham et castrés, injectés avec la finastéride ont présenté une réponse nociceptive au test de la pince calibrée plus faible que les animaux ayant reçu le

véhicule. Ces résultats suggèrent que les hormones gonadiques, mais pas leurs métabolites, auraient un effet sur les mécanismes descendants de modulation de la douleur. Cependant, ces derniers affecteraient la transmission nociceptive par un mécanisme vraisemblablement spinal et sexe dépendant. De plus, une altération de l'expression génique des sous-unités composant le récepteur GABA_A est présente dans la moelle épinière et le tronc cérébral. Cette étude a été l'une des premières qui s'est intéressée à la présence ou l'absence des neurostéroïdes dans les mécanismes de modulation de la douleur. De plus, la différence d'implication des neurostéroïdes lors de la transmission de l'information nociceptive était décrite pour la première fois. Ce résultat est particulièrement important considérant que le rôle des neurostéroïdes dans la douleur est généralement étudié chez les mâles uniquement.

The role of gonadal hormones and neurosteroids in the modulation of swim-stress induced analgesia in rats

Coulombe, Marie-Andrée^{1,2}; Gaumont, Isabelle¹; Lelièvre, Vincent²; Poisbeau, Pierrick²; Marchand, Serge¹

Affiliation

¹ Département de chirurgie, Service de neurochirurgie, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

² Centre National de la Recherche Scientifique and Université de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Département Nociception et Douleur, Strasbourg, France

Running title: Steroids and stress-induced analgesia

Corresponding author

Serge Marchand, PhD

Équipe de recherche en douleur, Département de chirurgie, Service de neurochirurgie, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke,

3001, 12e avenue Nord,

Sherbrooke, Québec, Canada

J1H 5N4

Tel: +1-819-346-1110x15889

E-mail address: Serge.Marchand@USherbrooke.ca

Abstract

Sex differences in pain perception and analgesia are described by both clinical and pre-clinical research. Previous observations strongly suggested the involvement of gonadal hormones on stress-induced analgesia and pain modulation mechanisms. It is however unclear which of gonadal hormones or their metabolites are responsible for these effects. Both are involved in pain/stress conditions and potential effectors in pain modulation. The aim of this study was to evaluate the relationship between gonadal hormones and neurosteroids in the shaping of nociception and especially swim stress-induced analgesia (SSIA). Gonadectomized and sham-gonadectomized male and female Sprague Dawley rats were stressed using a forced swim of 10 minutes at 22°C. Finasteride, a 5 α -reductase inhibitor, was injected SC to inhibit the synthesis of 3 α 5 α -reduced metabolites. Nociceptive thresholds were measured with calibrated forceps. Results showed that 1) Male rats had greater SSIA compared to females. Male gonadectomy decreased SSIA's amplitude. 2) Finasteride pretreatment did not influence SSIA's amplitude in any group. 3) However, finasteride injections decreased the basal nociceptive threshold of gonadectomized and sham-gonadectomized male rats. In conclusion, our findings suggest that descending pain modulation systems are mainly influenced by androgens with no significant effect of 3 α 5 α -reduced metabolites. However, 5 α -reduced metabolites seem to finely tune nociceptive thresholds. These steroids are likely to be involved in the acute response to pain, in a sex-specific manner.

Key words: Nociception - Stress-Induced Analgesia - Sex - Neurosteroids - Finasteride

1. Introduction

Pain modulation controls have been shown deficient in several idiopathic pain syndromes such as tension-type headache, temporomandibular joint (TMJ) pain, pain symptoms in chronic fatigue syndrome, atypical trigeminal neuralgia, irritable bowel syndrome and fibromyalgia syndrome (Cathcart et al., 2010; Julien et al., 2005; King et al., 2009; Leonard et al., 2009; Meeus et al., 2008; Seifert et al., 2009). Among these pathologies, chronic tension-type headache, facial pain, TMJ pain and fibromyalgia syndrome, are of higher prevalence in women (Johansson et al., 2003; McNally et al., 2006; Rasmussen, 1993; Rieder et al., 1983; Riley et al., 2001; Sandler, 1990; Stovner et al., 2007). Sex differences in pain perception and analgesia are also well described by both clinical and pre-clinical studies (Craft, 2003; Fillingim et al., 2009; Mogil, 2012). In fact, women have generally lower pain thresholds and lower pain tolerance than men (LeResche et al., 2003; Riley et al., 1998; Romero and Bodnar, 1986; Wolfe et al., 1995). This sex dimorphism is also observed in the pain modulatory system (Quiton and Greenspan, 2007; Romero and Bodnar, 1986; Staud et al., 2003).

It is known that descending modulation of pain can be triggered by a noxious stimulation, a stressful situation, physical exercise, or a placebo effect (Fillingim et al., 2009). Swim stress-induced analgesia (SSIA) is often used to study pain modulation systems in rodents. Two types of SSIA have been described: naloxone sensitive (opioidergic SSIA), and naloxone insensitive (non-opioidergic SSIA, inhibited by NMDA receptor antagonist) (Marek et al., 1991; O'Connor and Chipkin, 1984). There is a clear relation between stress intensity and the neurochemical nature of the reported analgesia (Mogil et al., 1996). It is generally accepted that higher stress is related to a non-opioidergic analgesia.

Circulating steroids and sexual dimorphisms of the central nervous system have been identified as potential factors contributing to the sex differences in pain responses, pain modulation systems and the prevalence of some chronic pain

conditions in women (Aloisi, 2003; Aloisi and Bonifazi, 2006; Craft et al., 2004; Gaumond et al., 2002; Gaumond et al., 2005; Kuba and Quinones-Jenab, 2005; Mogil and Belknap, 1997). Sex steroids are produced by the gonads but can also be synthesised by the central nervous system (Corpechot et al., 1981). They regulate the transcription and the expression of receptors or ion channels through their binding to nuclear receptors (Cyr et al., 2000a; Cyr et al., 2000b; D'Souza et al., 2003; Truss and Beato, 1993). However, sex hormones may also act as neuroactive steroids (NS) influencing neuronal excitability through fast membrane-mediated actions (Schlichter et al., 2006). By modulating neuronal excitability and neurotransmission in the nociceptive system, they are likely to control nociceptive integration and pain responses (Belelli et al., 2006; Fillingim et al., 2009; Keller et al., 2004; Poisbeau et al., 2005).

Several NS potentiate and activate membrane-bound receptor-channels in neurons. $3\alpha,5\alpha$ -reduced steroids ($3\alpha,5\alpha$ NS) can be synthesized from progesterone (THP: allopregnanolone; THDOC: allotetrahydrodeoxy-corticosterone) or testosterone (α -diol: allotetrahydrotestosterone) (Schlichter et al., 2006). These steroids are mainly known to be potent positive allosteric modulators of GABA_A receptor-channels. Furthermore, they were shown to have antinociceptive and analgesic properties after systemic, intrathecal, and intra-cerebro-ventricular injections (Charlet et al., 2008; Frye and Duncan, 1996; Frye et al., 1996).

An increased synthesis of endogenous $3\alpha,5\alpha$ NS was demonstrated in inflammatory and neuropathic models of pain (Patte-Mensah et al., 2006; Poisbeau et al., 2005). Production of $3\alpha,5\alpha$ NS was also associated with tonic inhibition in the spinal cord leading to a decrease of pain symptoms in the carrageenan model of inflammatory pain (Poisbeau et al., 2005). It is interesting to note that other stressful conditions, such as forced swim stress, has been associated to a rapid and massive increase of $3\alpha,5\alpha$ NS concentration in the brain and plasma (Purdy et al., 1991).

In the present study, we evaluated the contribution of sex hormones and $3\alpha,5\alpha$ -DHEAS in nociceptive responses and descending inhibitory controls of pain using a forced swim stress paradigm and mechanical threshold measures. In addition, the expression of specific GABA_A receptor subunits was characterized in these animals in order to understand the sex differences in pain perception and the contribution of gonadal hormones in these variations.

2. Methods

2.1 Animals

Sprague Dawley rats (Janvier, Le Genest St. Isle, France) were used in this study. Rats were housed in groups of four (same sex and same hormonal condition) in environmentally controlled facility (22°C, 55% of relative humidity, 12/12h light/dark cycle) with *ad libitum* access to food and water. Rats were acclimatized for at least one week to handling and to the experimental apparatus before the testing period to reduce the stress brought by the environment (Abbott et al., 1986; Capone and Aloisi, 2004). All experiments were performed on 12 week-old rats, between 09:00 and 14:00 to reduce any variation related to circadian rhythm. All procedures were performed in accordance with European committee council directive of September 22, 2010 (2010/63/EU). Legal authorization to conduct the experiments has been obtained from the French Department of Agriculture (License number 67-116 to PP) and procedures were approved by the regional ethic committee (AL/10/29/12/09). All efforts were made to minimize the number of animals used and their possible suffering.

2.2 Gonadectomy

Females were bilaterally ovariectomized 8 weeks after birth (2 weeks after their arrival) under isoflurane anesthesia (3% in O₂) using a standard surgical procedure. Both sides of the back were shaved, between hips and thoracic cage, and disinfected with ethanol 70%. The skin was desensitized with topical lidocaine 0.5%. A half-centimeter incision was made through the skin, connective tissue and muscle layer. The ovary, associated fat pad, Fallopian tube and upper uterine horn was exteriorized. The upper uterine horn and the blood supply vessel were clamped for a minute and then the ovary was cut and discarded, leaving the uterus intact. For sham ovariectomy, the ovary, associated fat pad, Fallopian tube and upper uterine horn were exteriorized and then returned to the peritoneum. The muscle wall and skin was sutured independently and bupivacain (250 cc) was subcutaneously injected around each incision. Males were castrated gonadectomized 8 weeks after birth (2 weeks

after their arrival) under isoflurane anesthesia (3% in O₂) using a standard surgical procedure. The scrotal area was shaved, disinfected with ethanol 70% and desensitized with topical lidocaine 0.5%. A one-centimeter transverse incision was made at midline scrotum. Both testes were exteriorized with the epididymis and the associated fat pad. The tubules were tied tightly with silk suture. Tissue below the knot (testes, epididymis and fat pad) was cut and discarded. For sham orchidectomy, the testes were exposed but not exteriorized and the incision was sutured. A 4-week period was allowed for recuperation from the surgery and elimination of any possible remaining sex hormones stored in fat. During that period, the animals were daily observed and regularly weighted to monitor their good health.

2.3 Behavioral testing

2.3.1 Drugs

Finasteride was used to inhibit the production of 5 α -reduced NS (Finn et al., 2006). Rats were pretreated with finasteride (50 mg/kg: 10% v/v ethanol in olive oil, SC) or vehicle (10% v/v ethanol in olive oil, SC), four times in a period of 7 days (on even days, and on the day of experimentation, one hour before the beginning of the testing). In order to characterize the nature of the forced swim stress (opioidergic or non-opioidergic), naloxone (2 mg/kg in saline 0.9%), MK-801 (0.1 mg/kg in saline 0.9 mg/kg) or saline (0.9%) was injected IP in intact male and female rats before the experimentation.

Animals were divided into four groups: vehicle (VEH) or finasteride (FIN) treatment, sham-gonadectomized female (F_{SH}); sham-gonadectomized male (M_{SH}); gonadectomized female (F_{GX}); gonadectomized male (M_{GX}).

2.3.2 Mechanical nociceptive threshold

Calibrated forceps (Bioseb, Chaville, France) were used to measure mechanical nociceptive threshold. Rats were previously acclimatized to be loosely restrained in a towel. An increasing force was applied using the calibrated forceps on

each hind paw. The pressure producing a withdrawal of the paw corresponded to the nociceptive threshold value. This manipulation was performed three times on each paw and the values were averaged.

2.3.3 Swim stress protocol

The forced swim stress was carried out in a cylindrical opaque plastic container (height: 82 cm; lower diameter: 36 cm; upper diameter: 45 cm). Escape from the container was impossible. Water temperature was monitored carefully by the experimenter and maintained at 22°C.

Baseline threshold was obtained one hour after the injection of finasteride/vehicle (one hour before the forced swim). One hour following the baseline threshold, rats were placed in the swimming area (22°C) for 10 minutes. At the end of the swim period, rats were removed from the water, dried with a towel, and placed in a cage lined with paper towels to dry off. Mechanical thresholds were tested 3, 10, 40, 70 and 180 minutes after the end of the swim stress procedure.

2.4 RNA extraction and quantification of gene expression by real-time PCR

In a separated experimentation, four animals of each group (F_{SH} ; M_{SH} ; F_{GX} ; M_{GX}) were used for quantitative PCR (polymerase chain reaction). Animals were sacrificed by decapitation; brainstem and lumbar spinal cord were collected and fast frozen on dry ice. Total RNA was extracted from these tissues according to a protocol derived from the original procedure of Chomczynski and Sacchi (1987), consisting of two independent total RNA extractions separated by a DNase I treatment (DNA-free™ kit, Ambion), as previously described in detail (Chomczynski and Sacchi, 1987; Lelievre et al., 2002). RNA quality and concentration were assessed by spectrophotometry and capillary electrophoresis on RNAsens biochips using Experion™ apparatus, according to the manufacturer's instructions (Biorad). Total RNA (800 ng) was subjected to reverse transcription using the Iscript™ kit from Biorad. Negative controls (samples in which reverse transcriptase was omitted) were

individually amplified by PCR using the different primer sets used in the present study to ensure the absence of genomic DNA contamination. To specifically amplify mRNA encoding various rat proteins, we designed the specific primer sets (sense and antisense respectively) using Oligo6.0 and M-fold software for GABA_A receptor (δ , γ) and chloride cotransporter (NKCC1 and KCC2). Primer sequences are given in Table 1.

Genes	Primer Sequences (<i>sense and reverse, respectively</i>)	Amplicon (<i>bp</i>)	Spanning <i>regions</i>	NCBI <i>Access</i>
GABA_A δ	5'-GCTGCCCTGGTGGAGTATG -3'OH 5'- CCTTGGCTTCGTGACCTTGAC-3'OH	96	1016-1102	NM017289
GABA_A γ	5'-AGGTCATGGAGGCTGTATCA -3'OH 5'-TCAGATCAAAGTACACGGACA -3'OH	109	694-806	NM183327
NKCC1	5' - GGGCCTCCTCACACGAAGAA -3'OH 5' TGAGGAGCCGAGGGTACTTCA - 3'OH	91	2047-2138	NM019229
KCC2	5'-ACTACAGCTGGCCACCTCGC -3'OH 5'-ATGCTGCCCTCAGAGAAACGC -3'OH	86	2507-2593	NM134363
HPRT	5'-TGGTGAAAAGGACCTCTCGAA-3'OH 5'-TCAAGGGCATATCCAACAACA-3'OH	99	637-727	NM013556

Table 1

Sequences of oligonucleotidic primers and their theoretical spanning regions of published genes from NCBI database used in the quantitative PCR. Quantification of the relative expressions of the above genes of interest was made using HPRT, that was found to remain highly stable among the different treatments, and was subsequently used as standard for quantification.

2.5 Data analyses

All statistical analyses were done using GraphPad Prism version 5.04 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

2.5.1 Baseline thresholds

Since all our samples were normally distributed (Shapiro-Wilk normality test), one-way ANOVA was used to compare means followed by Bonferroni *post-hoc* test to compare selected pairs (M_{SH} vs. F_{SH} ; M_{SH} vs. M_{GX} ; F_{SH} vs. F_{GX} ; F_{GX} vs. M_{GX}).

2.5.2 Measures of analgesia

Post-swim analgesia was expressed as a percentage of the maximum possible effect (%MPE), as calculated by the formula: $\%MPE = (\text{postswim threshold} - \text{baseline threshold}) / (\text{maximal possible response} - \text{baseline threshold}) \times 100$.

Time course of the analgesia was evaluated using a two-way ANOVA. Analgesia peaks were compared as means.

2.5.3 RNA quantification

Gene expression was quantified relatively to HPRT gene. Every measure was quantified in duplicate. Means were compared using one-way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* test for the same pairs.

3. Results

3.1 Characterization of the forced swim stress

The analgesia induced by the forced swim stress was inhibited by MK-801 but not by naloxone (Fig.1).

3.2 Involvement of gonadal hormones in the setting of nociceptive threshold

The mechanical nociceptive threshold of M_{SH} and F_{GX} was significantly higher compared to F_{SH} rats (Fig. 2A, M_{SH} : 373 ± 5 g vs. F_{SH} : 260 ± 5 g, $p < 0.0001$; F_{GX} : 325 ± 5 g vs. F_{SH} : 260 ± 5 g, $p < 0.0001$). In gonadectomized males, nociceptive threshold was decreased compared to SHAM males (Fig.2A, M_{SH} : 373 ± 5 g vs. M_{GX} : 346 ± 9 g, $p < 0.05$) and was not different from gonadectomized females thresholds (F_{GX} : 325 ± 5 g vs. M_{GX} : 346 ± 9 g, $p > 0.05$).

3.3 Contribution of gonadal hormones in SSIA

Time course of mechanical nociceptive thresholds were compared for the sham-operated and gonadectomized rats (Fig.3). Our results, expressed as maximal possible effect (%MPE), indicate that M_{SH} had greater SSIA compared to F_{SH} rats (M_{SH} : 20 ± 2 % vs. F_{SH} : 10 ± 2 %, $p < 0.001$). Male gonadectomy decreased the SSIA compared to SHAM males (M_{SH} : 20 ± 2 % vs. M_{GX} : 12 ± 2 %, $p < 0.001$). Although not significant, a trend shows a slight increase of the SSIA in gonadectomized rats (F_{GX}) compared to F_{SH} rats (F_{SH} : 10 ± 2 % vs. F_{GX} : 15 ± 2 %, $p > 0.05$).

3.4 $3\alpha5\alpha$ -reduced steroids setting of nociceptive threshold and of SSIA

Involvement of $3\alpha5\alpha$ -reduced metabolites on basal nociceptive threshold was measured using finasteride-treated rats. Nociceptive thresholds were measured with the calibrated forceps (Fig.4). Statistically significant differences were observed between finasteride-treated and vehicle-treated males (gonadectomized and SHAM-gonadectomized) (Figure 4 A, M_{SH} : VEH 373 ± 5 g vs. FIN 340 ± 2 g, $p < 0.01$; M_{GX} : VEH 346 ± 9 g vs. FIN 323 ± 7 g, $p < 0.01$). In all cases, finasteride-treated rats had decreased mechanical nociceptive thresholds compared with vehicle-treated animals.

Involvement of 3α -reduced metabolites on the amplitude of SSIA was measured after seven days of finasteride treatment. Analgesia induced by the swim stress was evaluated as maximal possible effect (%MPE). No significant difference was observed in any comparison between the groups (Figure 5).

3.5 Expression of GABA_A receptor subunits and of chloride co-transporter genes in the spinal cord and the brainstem

Expression of NKCC1, KCC2 and GABA_A receptor delta and gamma subunit genes was quantified in the rat spinal cord and brainstem. Relative gene expression of every group was compared using one-way ANOVA test followed by a Bonferroni *post-hoc* test for selected pairs (M_{SH} vs. F_{SH}; M_{SH} vs. M_{GX}; F_{SH} vs. F_{GX}; F_{GX} vs. M_{GX}).

Quantification of transcripts for the δ subunits of GABA_A receptors in the spinal cord showed that its expression was highly dependent on the hormonal status. Increased mRNA levels were also seen in gonadectomized animals (Figure 6A, F_{SH}: 0.0081 ± 0.0004 vs. F_{GX}: 0.0141 ± 0.0009 , $p < 0.0001$; M_{SH}: 0.0077 ± 0.0002 vs. M_{GX}: 0.0108 ± 0.0008 , $p < 0.05$). Expression of γ subunits constituting most of GABA_A receptors in the spinal cord was not affected by gonadectomy (Figure 6B). As illustrated in Fig.6C, these modulations resulted in an increase of the delta/gamma ratio for spinal GABA_A receptors in gonadectomized females compared to SHAM females (Figure 6C, M_{SH}: 1.21 ± 0.05 vs. F_{SH}: 1.11 ± 0.05 , $p > 0.05$; M_{SH}: 1.21 ± 0.05 vs. M_{GX}: 1.6 ± 0.1 , $p > 0.05$; F_{SH}: 1.11 ± 0.05 vs. F_{GX}: 2.0 ± 0.1 , $p < 0.001$; F_{GX}: 2.0 ± 0.1 vs. M_{GX}: 1.6 ± 0.1 , $p > 0.05$). In the brainstem, expression of the δ subunit was increased in gonadectomized females but decreased in M_{GX} compared to their sham-operated counterparts (Figure 6D, M_{SH}: 0.045 ± 0.004 vs. M_{GX}: 0.019 ± 0.002 , $p > 0.05$; F_{SH}: 0.0052 ± 0.0008 vs. F_{GX}: 0.08 ± 0.02 , $p < 0.01$). A strong difference was also noted between gonadectomized males and females (F_{GX}: 0.08 ± 0.02 vs. M_{GX}: 0.019 ± 0.002 , $p < 0.01$). As for the spinal cord, γ subunit expression in the

brainstem was not different between groups (Figure 6E). These modulations resulted in an increased delta/gamma ratio for F_{GX} and M_{SH} compared to females, and in a decreased ratio for M_{GX} compared to F_{GX} (Figure 6F, M_{SH} : 2.6 ± 0.4 vs. F_{SH} : 0.37 ± 0.06 , $p < 0.05$; M_{SH} : 2.6 ± 0.4 vs. M_{GX} : 0.95 ± 0.07 , $p > 0.05$; F_{SH} : 0.37 ± 0.06 vs. F_{GX} : 4.2 ± 0.7 , $p < 0.001$; F_{GX} : 4.2 ± 0.7 vs. M_{GX} : 0.95 ± 0.07 , $p < 0.001$).

Expression of chloride co-transporters NKCC1 and KCC2 gene transcripts was modulated by the hormonal status of the animals. NKCC1 genes was found to be slightly increased in gonadectomized rats compared to sham-operated animals in the spinal cord (Figure 7A, M_{SH} : 0.095 ± 0.007 vs. M_{GX} : 0.21 ± 0.02 , $p < 0.0001$; F_{SH} : 0.123 ± 0.007 vs. F_{GX} : 0.171 ± 0.008 , $p < 0.05$) but not in the brainstem (Figure 7D, M_{SH} : 0.08 ± 0.01 vs. M_{GX} : 0.09 ± 0.02 , $p > 0.05$; F_{SH} : 0.055 ± 0.009 vs. F_{GX} : 0.10 ± 0.01 , $p > 0.05$). Males had a decreased expression of KCC2 in the spinal cord compared to females (M_{SH} : 0.59 ± 0.02 vs. F_{SH} : 0.94 ± 0.05 , $p < 0.001$) or to gonadectomized males (M_{SH} : 0.59 ± 0.02 vs. M_{GX} : 0.95 ± 0.07 , $p < 0.001$). However, no variation of KCC2 across groups has been found in the brainstem (Figure 7E). As a result, the NKCC1/KCC2 spinal cord ratio increased in both gonadectomized groups (Fig.7C). This change was not observed in the brainstem (Figure 7F).

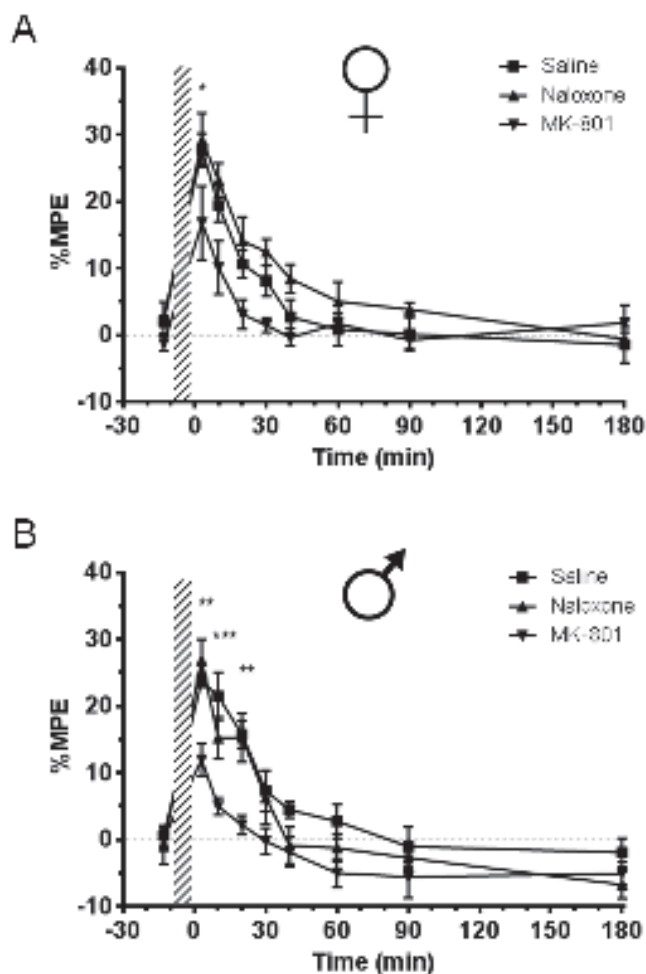


Figure 1: Sex-specific differences in swim stress induced analgesia

Swim-stress induced analgesia (SSIA), expressed as a percentage of the maximal possible effect, after a 10 min swim at 22°C, in male and female rats submitted to a mechanical stimulation. A) The SSIA was inhibited by MK-801 but not by naloxone in female rats, measured with the calibrated forceps. B) The SSIA was inhibited by MK-801 but not by naloxone in male rats. Data are expressed as means \pm SEM. Statistical analysis consisted of a two-way ANOVA followed by a Bonferroni *post-hoc* test for selected pairs. Symbols indicate statistical significance while comparing saline and MK-801 conditions (*). Significance code, *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$

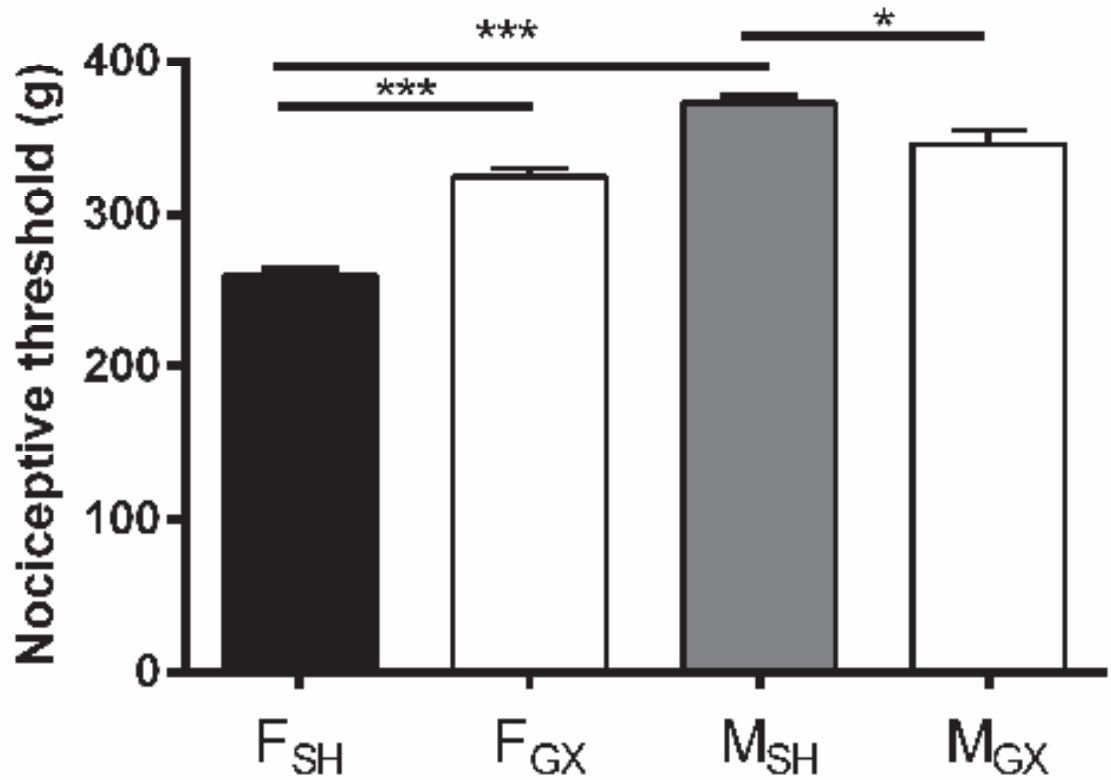


Figure 2. Gonadal hormones influences on mechanical nociceptive thresholds

Nociceptive mechanical threshold measured with the calibrated forceps for different groups of rats: sham-operated males (M_{SH}) and females (F_{SH}), gonadectomized males (M_{GX}) and gonadectomized females (F_{GX}). Data are expressed as means \pm SEM. Statistical analyzes were done using a one-way ANOVA followed by a Bonferroni *post-hoc* test for selected pairs. Asterisks indicate statistical significance: *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$.

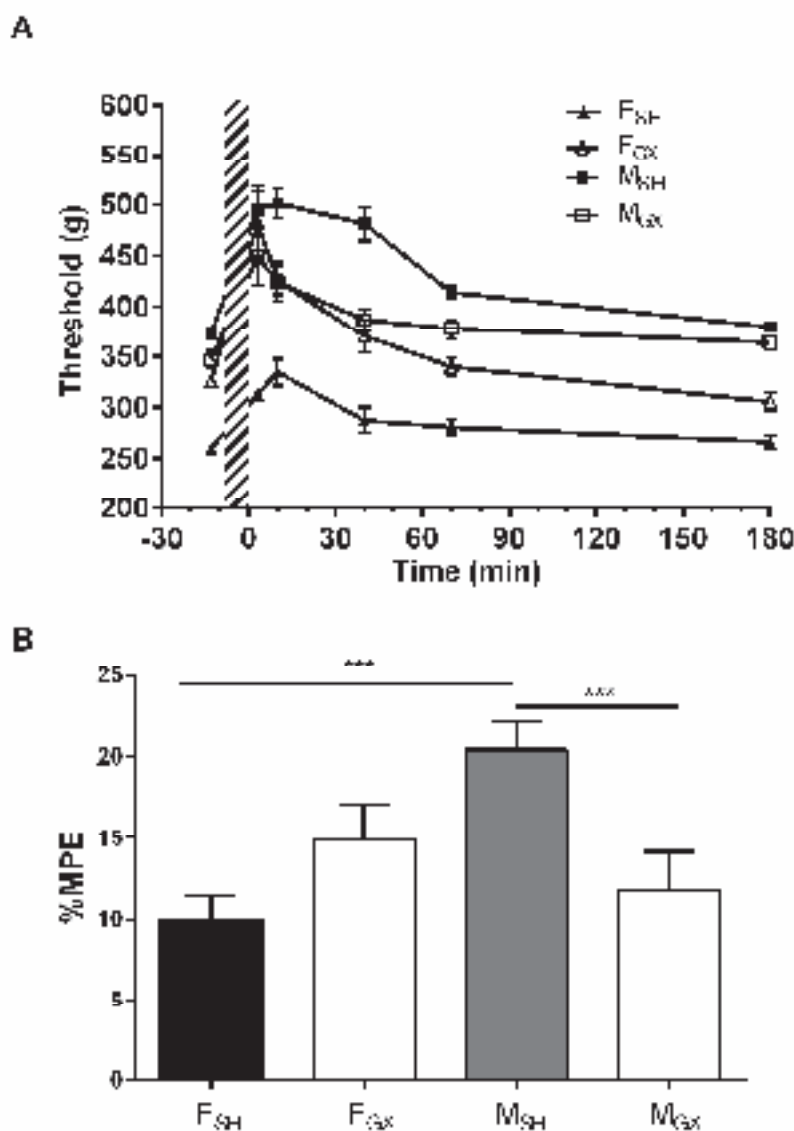


Figure 3: Impact of the hormonal status on SSIA

A. Time course of the mechanical nociceptive threshold before and after forced swim stress in the different groups of rats: sham-operated males (M_{SH}) and females (F_{SH}), gonadectomized males (M_{GX}) and gonadectomized females (F_{GX}). Gray line represents the swim stress. B. Analgesia illustrated as maximal possible effect (%MPE), 10 minutes after the swim stress procedure. Data are expressed as means \pm SEM. Curves were analyzed using a two-way ANOVA, followed by a Bonferroni post-hoc test for selected pairs. Histograms were analyzed using a one-way ANOVA, followed by a Dunn's *post-hoc* test for selected pairs. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$

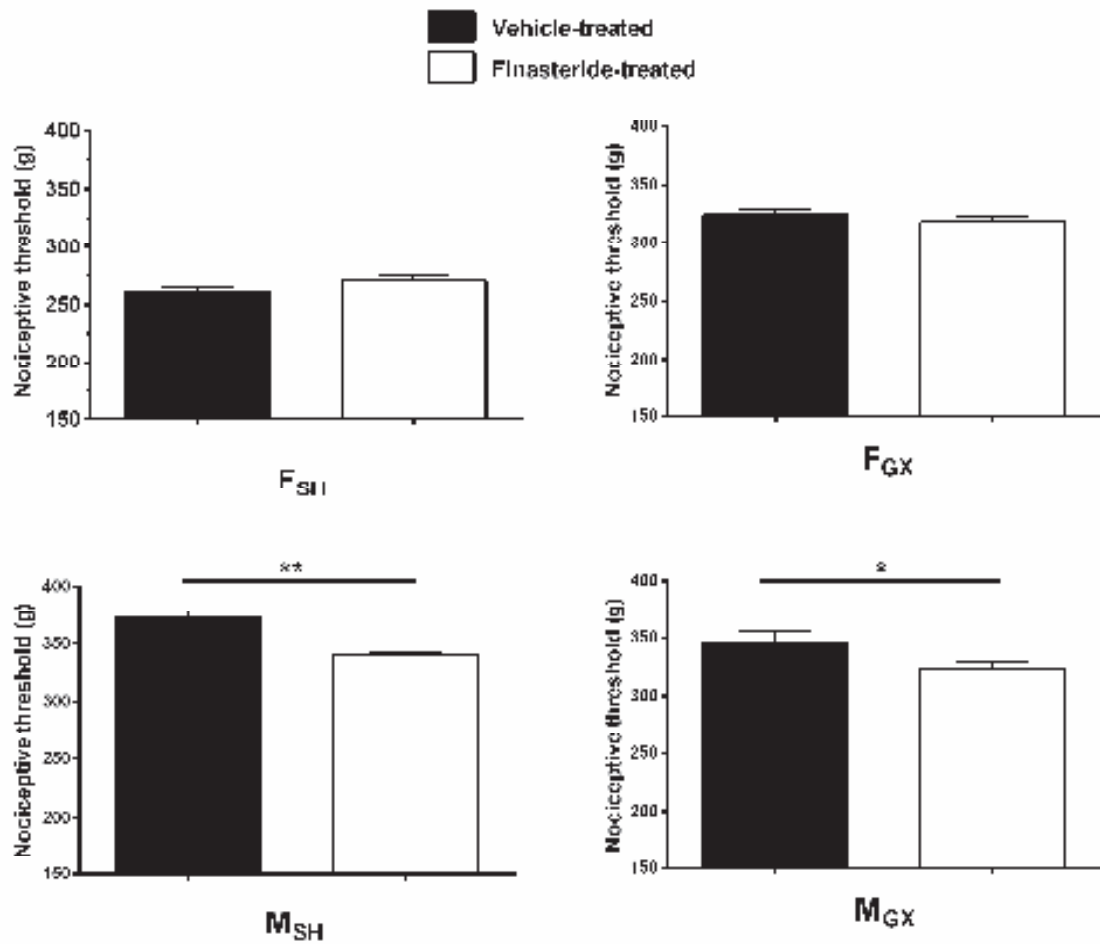


Figure 4: Neurosteroid contribution to the setting of nociceptive threshold

Basal nociceptive thresholds measured with calibrated forceps were evaluated in finasteride-treated and vehicle-treated rats. Data are expressed as means \pm SEM. **: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$.

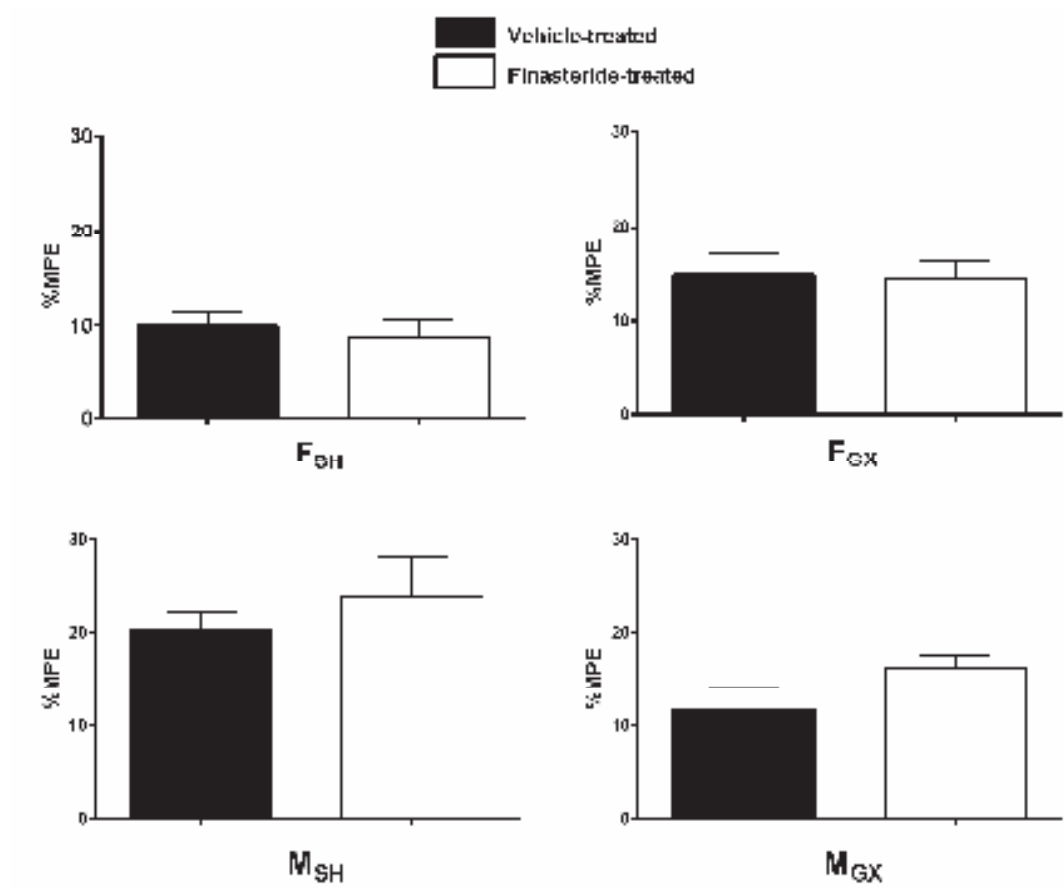


Figure 5: Neurosteroids and SSIA

Analgesia measured with the calibrated forceps, presented as maximal possible effect (%MPE), measured 10 minutes after the swim stress. Rats were pre-treated with finasteride (white bars) or vehicle (black bars). No significant difference was observed. Data are expressed as means \pm SEM.

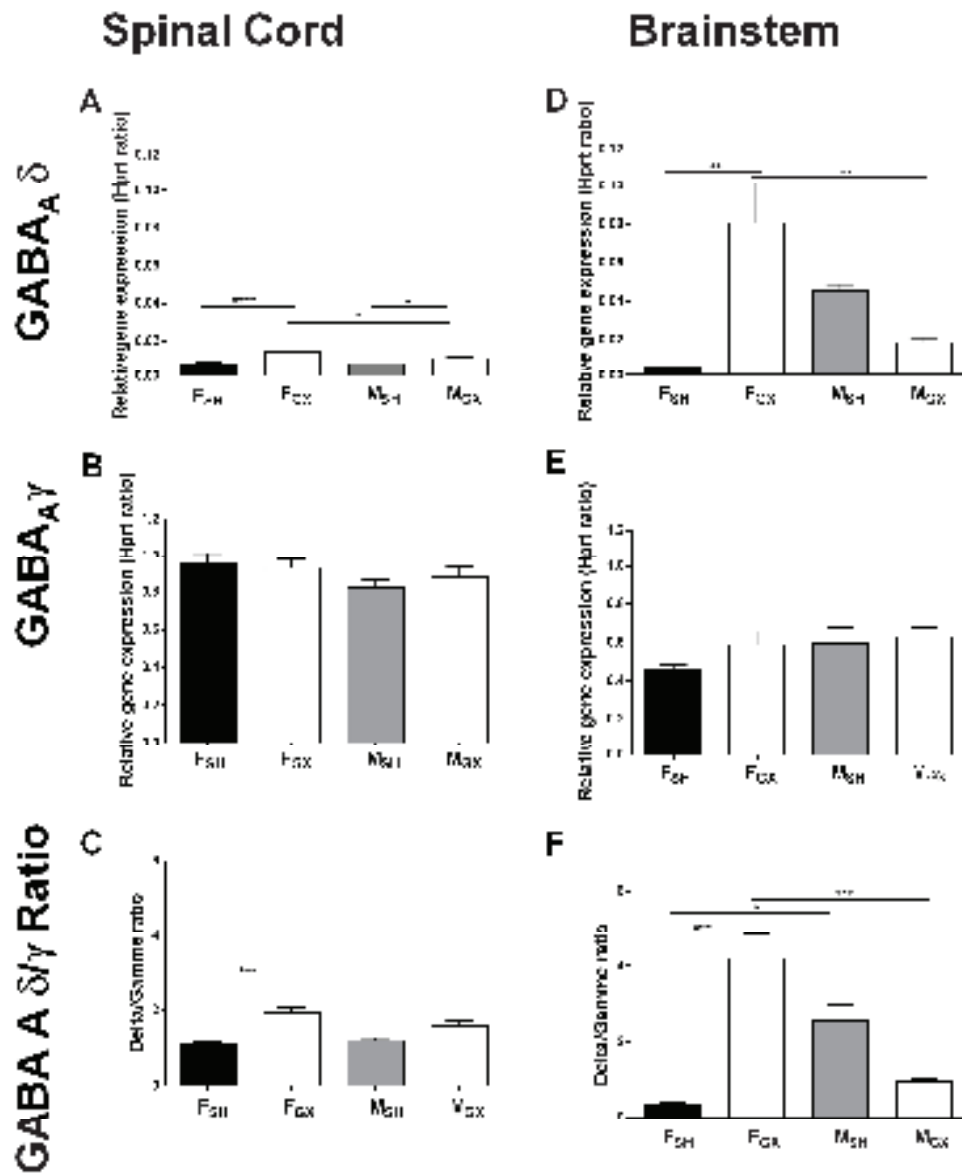


Figure 6

Relative expression and expression ratio of delta and gamma subunits composing GABA_A receptors in the spinal cord (A-B-C) and in the brainstem (D-E-F). Data are expressed as means \pm SEM. Statistical analyses were done using a one-way ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test for selected pairs. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$.

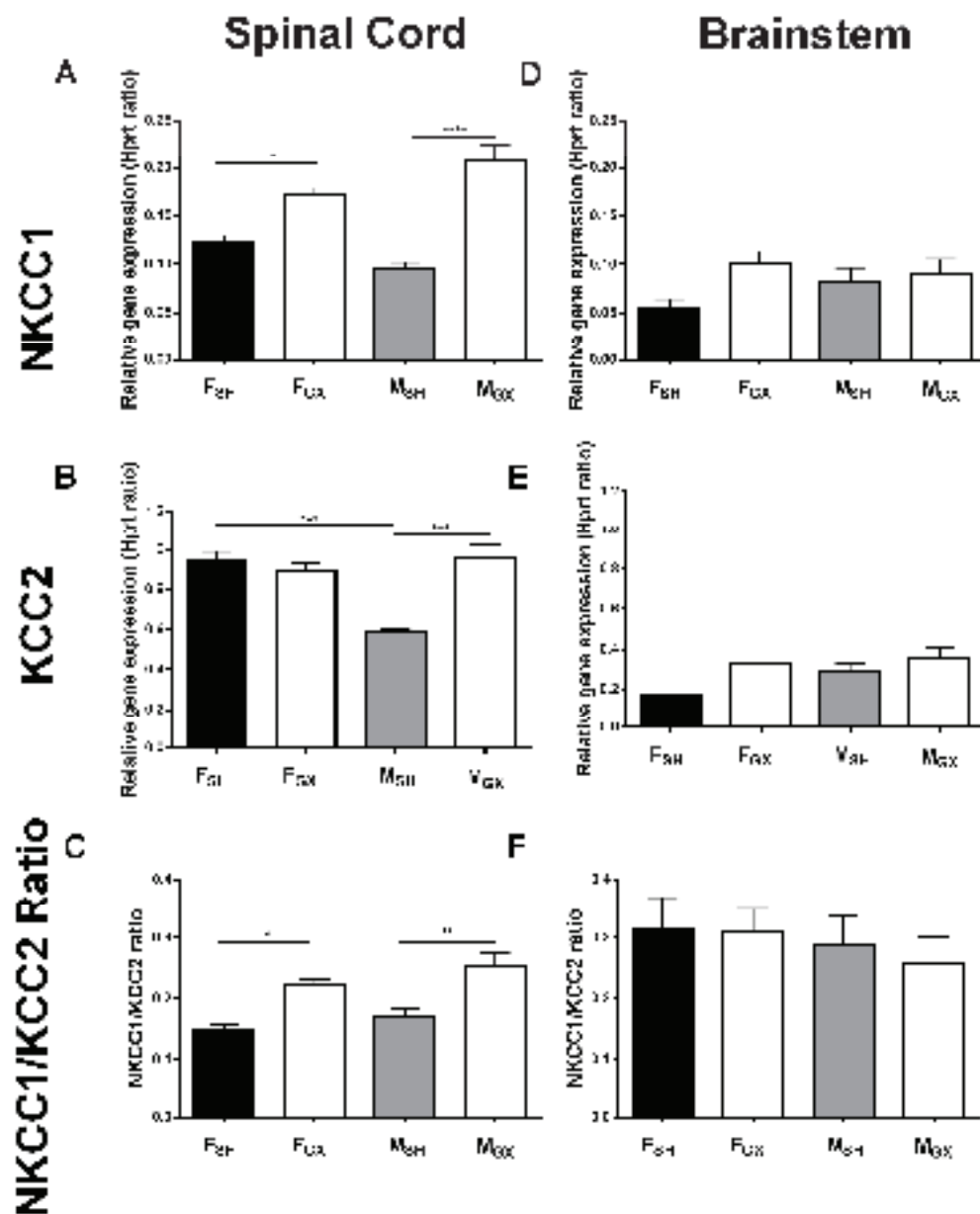


Figure 7

Expression and expression ratio of NKCC1 and KCC2 gene transcripts in the spinal cord (A-B-C) and in the brainstem (D-E-F) of sham-operated (black, grey bars) and gonadectomized (white bars) male (M) and female rats (F). Data are expressed as means \pm SEM. Statistical analyses were done using a one-way ANOVA followed by a Bonferroni *post-hoc* test for selected pairs. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$.

4. Discussion

This study aimed to evaluate the role of sex hormones and 5α -reduced metabolites on nociceptive thresholds and SSIA. Using the calibrated forceps test, we observed that males have a higher mechanical nociceptive threshold compared to females. Female's gonadectomy increased the nociceptive threshold whereas male's gonadectomy decreased it. These observations allowed us to confirm previous results indicating that hormones produced by ovaries are associated with hyper-nociception, whereas hormones released by testes induce hypo-nociception (Gaumond et al., 2002; Gaumond et al., 2005). Our present results indicate that gonadal hormones are important in the regulation of SSIA. Male rats have greater analgesia compared to female rats. Moreover, male castration strongly decreased the amplitude of SSIA. These results suggest that male gonadal hormones (mainly testosterone) are major players in this phenomenon. Finally, inhibition of the 5α -reductase did not alter the amplitude of SSIA. However, it seems to be involved in acute pain threshold in a sex-dependant way.

The paradigm of SSIA used in this study was first described to stimulate steroidogenesis. The increase of several 5α -reduced metabolites, in the plasma and the brain, was clearly described previously (Purdy et al., 1991). We determine that this 10 min swim stress at 22°C produces a non-opioid analgesia both in male and female rats.

The main result of this experiment was the clear implication of male gonadal hormones on pain threshold and SSIA. This was not unexpected because sex hormones have receptors throughout the central nervous system and many links can be found between receptors localization and pain mechanisms. Testosterone, which seems to play an important role in SSIA variations, has been described as antinociceptive during acute and inflammatory pain (Aloisi et al., 2004; Gaumond et al., 2002; Gaumond et al., 2005). However, its involvement in pain descending control is less obvious. As mentioned earlier, testosterone can bind nuclear AR but it

can also act through membrane receptors as NS. Testosterone has been described as a positive modulator of GABA_A receptor and a negative modulator of 5HT₃ receptor (Dubrovsky, 2005; Rupprecht and Holsboer, 1999; Rupprecht, 2003; Wetzel et al., 1998). It is important to consider that testosterone may also act through its aromatization to estradiol or by its metabolism to dihydrotestosterone or 3 α -androstenediol.

Several hypotheses can be raised to explain our results with regards to the multiple targets of testosterone. First, we cannot exclude a possible binding and allosteric modulation of testosterone to GABA_A receptors. GABAergic interneurons are well known to decrease nociceptive information in the spinal cord through the inhibition of afferent fibers. In contrast, the recruitment of GABAergic neurons in the brainstem produces a global pronociceptive effect (Behbehani et al., 1990; Gilbert and Franklin, 2001; Koyama et al., 1998). Considering that testosterone is described as a positive modulator of GABA_A receptor function (*i.e.* which would have resulted in a weaker analgesia), it is unlikely to be a critical modulating factor on SSIA. A second hypothesis is associated with the binding of testosterone to the 5HT₃ receptor. Serotonin (5HT) is an important player in pain inhibition and facilitation. Antagonism of 5HT₃ receptors has shown to decrease formalin-associated behavior (Sufka and Giordano, 1991), decrease neuropathic pain in humans (Chen et al., 2009) and a preliminary study indicated that tropisetron produced clinical improvement of fibromyalgia syndrome (Papadopoulos et al., 2000). The pronociceptive effect of 5HT₃ seems to be associated with its localization on peptidergic primary afferents (Conte et al., 2005), but also with its implication in descending facilitation mechanisms (Asante and Dickenson, 2010). If we consider testosterone as a negative modulator of 5HT₃ receptors, knowing that 5HT₃ receptor is involved in descending facilitation, we could easily suggest that the binding of testosterone to 5HT₃ receptors resulted in an inhibition of the descending facilitation, leading to a greater analgesia as observed in intact males compared to castrated males.

Male gonadal hormones have been suggested to act on steroidogenesis through the modulation of enzymatic expression in the nervous system. In fact, castration of male rats induced an increase of immunoreactive cells expressing 5α -reductase in the anterior pituitary, but had no effect on 3α -HSD in the spinal cord (Coirini et al., 2002; Yokoi et al., 1996). We used injections of finasteride, a 5α -reductase inhibitor for both type 1 and type 2 isosymes, in order to inhibit $3\alpha5\alpha$ NS synthesis (Azzolina et al., 1997). This compound acts as a potent inhibitor of 5α -NS synthesis and leads to an increase in precursor level (Higashi et al., 2008; Mukai et al., 2008). Finasteride treatment has been previously validated in other models of steroidogenesis (Coulombe et al., 2012). However, this treatment had no effect on SSIA in any of our groups. These results strongly suggest that $3\alpha5\alpha$ NS are not significantly involved in SSIA induced by our experimental conditions. It is important to consider that systemic finasteride injections can alter gonadal, adrenal and hypophyseal hormones. In fact, it has been observed in a clinical study that finasteride treatment (PO 5mg/day) increased testosterone levels and decreased FSH and LH serum levels (Uygur et al., 1998).

To further investigate the molecular mechanisms involved in these results, we have quantified $GABA_A$ receptor subunits and chloride co-transporters. These receptors are both contributing to the efficacy of inhibitory controls relying on chloride homeostasis. An impairment of chloride gradients, due for example to the down regulation of spinal KCC2 chloride exporters, has been demonstrated to account for neuropathic pain symptoms in animal models (Coull et al., 2003; Ferrini et al., 2013). The expression of delta subunit containing $GABA_A$ receptors is also a critical determinant of brain inhibition considering their location at extrasynaptic sites and their exquisite sensitivity to steroids (Maguire et al., 2005; Stell et al., 2003). Changes in the expression of $GABA_A$ subunit δ were observed between our four groups in the spinal cord and the brainstem. This variation was also observed by other teams (Biggio et al., 2006; Gonzalez-Flores et al., 2004; Maguire et al., 2005). However, none of them could specifically explain the effect of gonadal hormones or

the effect of $3\alpha5\alpha$ NS on nociceptive threshold in intact and castrated males. This result sustains a neuronal plasticity associated with the hormonal status (gonadectomy of male and female rats, as well as the dimorphism between male and female). However, this neuronal plasticity cannot explain our results and lead us to the conclusion that the effect of hormonal status on pain transmission and pain modulation is driven by the activational effect of these hormones.

5. Conclusion

We suggest here that $3\alpha5\alpha$ NS do not affect significantly the efficacy of pain inhibitory control in this model of SSIA. However, we observed that pain thresholds measured with the calibrated forceps were decreased in males (gonadectomized and sham-gonadectomized) treated with finasteride. These results showed that $3\alpha5\alpha$ NS act differently on pain transmission mechanisms in males and females. In overall, it seems that $3\alpha5\alpha$ NS do not have the same influence on pain transmission compared to descending pain modulation.

Acknowledgments

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Institut Universitaire de France. MA Coulombe holds a doctoral research award from the Canadian Institute of Health Research (CIHR). Dr Marchand is a supported member of the Centre de recherche clinique Étienne-Le Bel of the Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke. Dr Marchand holds grants from the CIHR.

References

- Abbott, F.V., Franklin, K.B., Connell, B., 1986. The stress of a novel environment reduces formalin pain: possible role of serotonin. *Eur J Pharmacol.* 126, 141-4.
- Aloisi, A.M., 2003. Gonadal hormones and sex differences in pain reactivity. *Clin J Pain.* 19, 168-74.
- Aloisi, A.M., Ceccarelli, I., Fiorenzani, P., De Padova, A.M., Massafra, C., 2004. Testosterone affects formalin-induced responses differently in male and female rats. *Neurosci Lett.* 361, 262-4.
- Aloisi, A.M., Bonifazi, M., 2006. Sex hormones, central nervous system and pain. *Horm Behav.* 50, 1-7.
- Asante, C.O., Dickenson, A.H., 2010. Descending serotonergic facilitation mediated by spinal 5-HT₃ receptors engages spinal rapamycin-sensitive pathways in the rat. *Neurosci Lett.* 484, 108-12.
- Azzolina, B., Ellsworth, K., Andersson, S., Geissler, W., Bull, H.G., Harris, G.S., 1997. Inhibition of rat alpha-reductases by finasteride: evidence for isozyme differences in the mechanism of inhibition. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 61, 55-64.
- Behbehani, M.M., Jiang, M.R., Chandler, S.D., Ennis, M., 1990. The effect of GABA and its antagonists on midbrain periaqueductal gray neurons in the rat. *Pain.* 40, 195-204.
- Belelli, D., Herd, M.B., Mitchell, E.A., Peden, D.R., Vardy, A.W., Gentet, L., Lambert, J.J., 2006. Neuroactive steroids and inhibitory neurotransmission: mechanisms of action and physiological relevance. *Neuroscience.* 138, 821-9.
- Biggio, F., Gorini, G., Caria, S., Murru, L., Mostallino, M.C., Sanna, E., Follesa, P., 2006. Plastic neuronal changes in GABA(A) receptor gene expression induced by progesterone metabolites: in vitro molecular and functional studies. *Pharmacol Biochem Behav.* 84, 545-54.
- Capone, F., Aloisi, A.M., 2004. Refinement of pain evaluation techniques. The formalin test. *Ann Ist Super Sanita.* 40, 223-229.
- Cathcart, S., Winefield, A.H., Lushington, K., Rolan, P., 2010. Noxious inhibition of temporal summation is impaired in chronic tension-type headache. *Headache.* 50, 403-12.
- Charlet, A., Lasbennes, F., Darbon, P., Poisbeau, P., 2008. Fast non-genomic effects of progesterone-derived neurosteroids on nociceptive thresholds and pain symptoms. *Pain.* 139, 603-9.
- Chen, Y., Oatway, M.A., Weaver, L.C., 2009. Blockade of the 5-HT₃ receptor for days causes sustained relief from mechanical allodynia following spinal cord injury. *J Neurosci Res.* 87, 418-24.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162, 156-9.

- Coirini, H., Gouezou, M., Liere, P., Delespierre, B., Pianos, A., Eychenne, B., Schumacher, M., Guennoun, R., 2002. 3 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in rat spinal cord. *Neuroscience*. 113, 883-91.
- Conte, D., Legg, E.D., McCourt, A.C., Silajdzic, E., Nagy, G.G., Maxwell, D.J., 2005. Transmitter content, origins and connections of axons in the spinal cord that possess the serotonin (5-hydroxytryptamine) 3 receptor. *Neuroscience*. 134, 165-7.
- Corpechot, C., Robel, P., Axelson, M., Sjovall, J., Baulieu, E.E., 1981. Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 78, 4704-7.
- Coull, J.A.M., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, S.A., Nault, F., S k, 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, 938-42.
- Coulombe, M.A., Gaumond, I., Lelievre, V., Marchand, S., Poisbeau, P., 2012. Progesterone withdrawal effect on descending modulation of pain involves neurosteroids. In 14th World Congress on Pain. Vol., IASP, ed. eds.
- Craft, R.M., 2003. Sex differences in opioid analgesia: "from mouse to man". *Clin J Pain*. 19, 175-6.
- Craft, R.M., Mogil, J.S., Aloisi, A.M., 2004. Sex differences in pain and analgesia: the role of gonadal hormones. *Eur J Pain*. 8, 397-411.
- Cyr, M., Ghribi, O., Di Paolo, T., 2000a. Regional and selective effects of oestradiol and progesterone on NMDA and AMPA receptors in the rat brain. *J Neuroendocrinol*. 12, 445-452.
- Cyr, M., Landry, M., Di Paolo, T., 2000b. Modulation by estrogen-receptor directed drugs of 5-hydroxytryptamine-2A receptors in rat brain. *Neuropsychopharmacology*. 23, 69-78.
- D'Souza, D.N., Harlan, R.E., Garcia, M.M., 2003. Modulation of glutamate receptor expression by gonadal steroid hormones in the rat striatum. *Brain Res Bull*. 59, 289-292.
- Dubrovsky, B.O., 2005. Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 29, 169-92.
- Ferrini, F., Trang, T., Mattioli, T.A., Laffray, S., Del'guidice, T., Lorenzo, L.E., Castonguay, A., Doyon, N., Zhang, W., Godin, A.G., Mohr, D., Beggs, S., Vandal, K., Beaulieu, J.M., Cahill, C.M., Salter, M.W., De Koninck, Y., 2013. Morphine hyperalgesia gated through microglia-mediated disruption of neuronal Cl(-) homeostasis. *Nat Neurosci*. 16, 183-92.
- Fillingim, R.B., King, C.D., Ribeiro-Dasilva, M.C., Rahim-Williams, B., Riley, J.L., 3rd, 2009. Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. *J Pain*. 10, 447-485.
- Finn, D.A., Beadles-Bohling, A.S., Beckley, E.H., Ford, M.M., Gililand, K.R., Gorin-Meyer, R.E., Wiren, K.M., 2006. A new look at the 5alpha-reductase inhibitor finasteride. *CNS Drug Rev*. 12, 53-76.
- Frye, C.A., Duncan, J.E., 1996. Estradiol benzoate potentiates neuroactive steroids' effects on pain sensitivity. *Pharmacol Biochem Behav*. 53, 27-32.

- Frye, C.A., Van Keuren, K.R., Rao, P.N., Erskine, M.S., 1996. Analgesic effects of the neurosteroid 3 alpha-androstanediol. *Brain Res.* 709, 1-9.
- Gaumond, I., Arsenault, P., Marchand, S., 2002. The role of sex hormones on formalin-induced nociceptive responses. *Brain Res.* 958, 139-145.
- Gaumond, I., Arsenault, P., Marchand, S., 2005. Specificity of female and male sex hormones on excitatory and inhibitory phases of formalin-induced nociceptive responses. *Brain Res.* 1052, 105-11.
- Gilbert, A.K., Franklin, K.B., 2001. GABAergic modulation of descending inhibitory systems from the rostral ventromedial medulla (RVM). Dose-response analysis of nociception and neurological deficits. *Pain.* 90, 25-36.
- Gonzalez-Flores, O., Sanchez, N., Garcia-Juarez, M., Lima-Hernandez, F.J., Gonzalez-Mariscal, G., Beyer, C., 2004. Estradiol and testosterone modulate the anesthetic action of the GABA-A agonist THIP, but not of the neurosteroid 3alpha,5beta-pregnanolone in the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 172, 283-90.
- Higashi, T., Yokoi, H., Nagura, Y., Nishio, T., Shimada, K., 2008. Studies on neurosteroids XXIV. Determination of neuroactive androgens, androsterone and 5alpha-androstane-3alpha,17beta-diol, in rat brain and serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr.* 22, 1434-41.
- Johansson, A., Unell, L., Carlsson, G.E., Soderfeldt, B., Halling, A., 2003. Gender difference in symptoms related to temporomandibular disorders in a population of 50-year-old subjects. *J Orofac Pain.* 17, 29-35.
- Julien, N., Goffaux, P., Arsenault, P., Marchand, S., 2005. Widespread pain in fibromyalgia is related to a deficit of endogenous pain inhibition. *Pain.* 114, 295-302.
- Keller, A.F., Breton, J.D., Schlichter, R., Poisbeau, P., 2004. Production of 5alpha-reduced neurosteroids is developmentally regulated and shapes GABA(A) miniature IPSCs in lamina II of the spinal cord. *J Neurosci.* 24, 907-15.
- King, C.D., Wong, F., Currie, T., Mauderli, A.P., Fillingim, R.B., Riley, J.L., 3rd, 2009. Deficiency in endogenous modulation of prolonged heat pain in patients with Irritable Bowel Syndrome and Temporomandibular Disorder. *Pain.* 143, 172-8.
- Koyama, N., Hanai, F., Yokota, T., 1998. Does intravenous administration of GABA(A) receptor antagonists induce both descending antinociception and touch-evoked allodynia? *Pain.* 76, 327-36.
- Kuba, T., Quinones-Jenab, V., 2005. The role of female gonadal hormones in behavioral sex differences in persistent and chronic pain: clinical versus preclinical studies. *Brain Res Bull.* 66, 179-188.
- Lelievre, V., Hu, Z., Byun, J.Y., Ioffe, Y., Waschek, J.A., 2002. Fibroblast growth factor-2 converts PACAP growth action on embryonic hindbrain precursors from stimulation to inhibition. *J Neurosci Res.* 67, 566-73.
- Leonard, G., Goffaux, P., Mathieu, D., Blanchard, J., Kenny, B., Marchand, S., 2009. Evidence of descending inhibition deficits in atypical but not classical trigeminal neuralgia. *Pain.* 147, 217-23.

- LeResche, L., Mancl, L., Sherman, J.J., Gandara, B., Dworkin, S.F., 2003. Changes in temporomandibular pain and other symptoms across the menstrual cycle. *Pain*. 106, 253-61.
- Maguire, J.L., Stell, B.M., Rafizadeh, M., Mody, I., 2005. Ovarian cycle-linked changes in GABA(A) receptors mediating tonic inhibition alter seizure susceptibility and anxiety. *Nat Neurosci*. 8, 797-804.
- Marek, P., Page, G.G., Ben-Eliyahu, S., Liebeskind, J.C., 1991. N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor antagonist MK-801 blocks non-opioid stress-induced analgesia. I. Comparison of opiate receptor-deficient and opiate receptor-rich strains of mice. *Brain Res*. 551, 293-6.
- McNally, J.D., Matheson, D.A., Bakowsky, V.S., 2006. The epidemiology of self-reported fibromyalgia in Canada. *Chronic Dis Can*. 27, 9-16.
- Meeus, M., Nijs, J., Van de Wauwer, N., Toeback, L., Truijen, S., 2008. Diffuse noxious inhibitory control is delayed in chronic fatigue syndrome: an experimental study. *Pain*. 139, 439-48.
- Mogil, J.S., Sternberg, W.F., Balian, H., Liebeskind, J.C., Sadowski, B., 1996. Opioid and nonopioid swim stress-induced analgesia: a parametric analysis in mice. *Physiol Behav*. 59, 123-32.
- Mogil, J.S., Belknap, J.K., 1997. Sex and genotype determine the selective activation of neurochemically-distinct mechanisms of swim stress-induced analgesia. *Pharmacol Biochem Behav*. 56, 61-6.
- Mogil, J.S., 2012. Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon. *Nat Rev Neurosci*. 13, 859-66.
- Mukai, Y., Higashi, T., Nagura, Y., Shimada, K., 2008. Studies on neurosteroids XXV. Influence of a 5alpha-reductase inhibitor, finasteride, on rat brain neurosteroid levels and metabolism. *Biol Pharm Bull*. 31, 1646-50.
- O'Connor, P., Chipkin, R.E., 1984. Comparisons between warm and cold water swim stress in mice. *Life Sci*. 35, 631-9.
- Papadopoulos, I.A., Georgiou, P.E., Katsimbri, P.P., Drosos, A.A., 2000. Treatment of fibromyalgia with tropisetron, a 5HT3 serotonin antagonist: a pilot study. *Clin Rheumatol*. 19, 6-8.
- Patte-Mensah, C., Kibaly, C., Boudard, D., Schaeffer, V., Begle, A., Saredi, S., Meyer, L., Mensah-Nyagan, A.G., 2006. Neurogenic pain and steroid synthesis in the spinal cord. *J Mol Neurosci*. 28, 17-31.
- Poisbeau, P., Patte-Mensah, C., Keller, A.F., Barrot, M., Breton, J.D., Luis-Delgado, O.E., Freund-Mercier, M.J., Mensah-Nyagan, A.G., Schlichter, R., 2005. Inflammatory pain upregulates spinal inhibition via endogenous neurosteroid production. *J Neurosci*. 25, 11768-76.
- Purdy, R.H., Morrow, A.L., Moore, P.H., Jr., Paul, S.M., 1991. Stress-induced elevations of gamma-aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88, 4553-7.
- Quiton, R.L., Greenspan, J.D., 2007. Sex differences in endogenous pain modulation by distracting and painful conditioning stimulation. *Pain*. 132 Suppl 1, S134-49.

- Rasmussen, B.K., 1993. Migraine and tension-type headache in a general population: precipitating factors, female hormones, sleep pattern and relation to lifestyle. *Pain*. 53, 65-72.
- Rieder, C.E., Martinoff, J.T., Wilcox, S.A., 1983. The prevalence of mandibular dysfunction. Part I: Sex and age distribution of related signs and symptoms. *J Prosthet Dent*. 50, 81-8.
- Riley, J.L., Robinson, M.E., Wade, J.B., Myers, C.D., Price, D.D., 2001. Sex differences in negative emotional responses to chronic pain. *J Pain*. 2 %6, 354-359 %&.
- Riley, J.L., 3rd, Robinson, M.E., Wise, E.A., Myers, C.D., Fillingim, R.B., 1998. Sex differences in the perception of noxious experimental stimuli: a meta-analysis. *Pain*. 74, 181-7.
- Romero, M.T., Bodnar, R.J., 1986. Gender differences in two forms of cold-water swim analgesia. *Physiol Behav*. 37, 893-7.
- Rupprecht, R., Holsboer, F., 1999. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci*. 22, 410-6.
- Rupprecht, R., 2003. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. *Psychoneuroendocrinology*. 28, 139-168.
- Sandler, R.S., 1990. Epidemiology of irritable bowel syndrome in the United States. *Gastroenterology*. 99, 409-15.
- Schlichter, R., Keller, A.F., De Roo, M., Breton, J.D., Inquimbert, P., Poisbeau, P., 2006. Fast nongenomic effects of steroids on synaptic transmission and role of endogenous neurosteroids in spinal pain pathways. *J Mol Neurosci*. 28, 33-51.
- Seifert, F., Kiefer, G., DeCol, R., Schmelz, M., Maihofner, C., 2009. Differential endogenous pain modulation in complex-regional pain syndrome. *Brain*. 132, 788-800.
- Staud, R., Robinson, M.E., Vierck, C.J., Price, D.D., 2003. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) attenuate temporal summation of second pain in normal males but not in normal females or fibromyalgia patients. *Pain*. 101, 167-74.
- Stell, B.M., Brickley, S.G., Tang, C.Y., Farrant, M., Mody, I., 2003. Neuroactive steroids reduce neuronal excitability by selectively enhancing tonic inhibition mediated by delta subunit-containing GABAA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100, 14439-44.
- Stovner, L., Hagen, K., Jensen, R., Katsarava, Z., Lipton, R., Scher, A., Steiner, T., Zwart, J.A., 2007. The global burden of headache: a documentation of headache prevalence and disability worldwide. *Cephalalgia*. 27, 193-210.
- Sufka, K.J., Giordano, J., 1991. Analgesic effects of S and R isomers of the novel 5-HT₃ receptor antagonists ADR-851 and ADR-882 in rats. *Eur J Pharmacol*. 204, 117-9.
- Truss, M., Beato, M., 1993. Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr Rev*. 14, 459-479.
- Uygur, M.C., Arik, A.I., Altug, U., Erol, D., 1998. Effects of the 5 alpha-reductase inhibitor finasteride on serum levels of gonadal, adrenal, and hypophyseal

- hormones and its clinical significance: a prospective clinical study. *Steroids*. 63, 208-13.
- Wetzel, C.H., Hermann, B., Behl, C., Pestel, E., Rammes, G., Zieglgansberger, W., Holsboer, F., Rupprecht, R., 1998. Functional antagonism of gonadal steroids at the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor. *Mol Endocrinol*. 12, 1441-51.
- Wolfe, F., Ross, K., Anderson, J., Russell, I.J., Hebert, L., 1995. The prevalence and characteristics of fibromyalgia in the general population. *Arthritis Rheum*. 38, 19-28.
- Yokoi, H., Tsuruo, Y., Miyamoto, T., Kitagawa, K., Futaki, S., Ishimura, K., 1996. Steroid 5 alpha-reductase type 1 immunolocalized in the anterior pituitary of intact and castrated male rats. *Histochem Cell Biol*. 106, 359-66.

ARTICLE 4

Progesterone withdrawal effect on descending modulation of pain involves neurosteroids

Auteurs de l'article: Marie-Andrée Coulombe, Isabelle Gaumond, Vincent Lelièvre, Pierrick Poisbeau, Serge Marchand.

Statut de l'article: soumis à *Pain* le 28 février 2013

Avant-propos: J'ai participé activement à toutes les étapes de ce projet de recherche, que ce soit l'écriture du protocole, les soumissions éthiques, les traitements hormonaux, les expérimentations comportementales, le prélèvement des tissus, l'analyse des données et l'écriture du manuscrit. L'expression génique des sous-unités du récepteur GABAA et des cotransporteurs NKCC1 et KCC2 a été mesurée par Pr Lelièvre. Prs Marchand et Poisbeau, de même qu'I. Gaumond, m'ont particulièrement aidé en révisant et corrigeant le manuscrit final.

Résumé : De plus en plus, la communauté scientifique parle de l'importance des variations d'hormones sexuelles plutôt que de leur présence à l'état stable. La phase lutéale est un moment du cycle menstruel où la progestérone est en forte concentration et chute subitement à un état de faible concentration. Ce moment particulier a été pointé dans plusieurs expérimentations mettant en relation le cycle menstruel et les mécanismes de contrôle descendants de la douleur (MCDD). Dans l'article précédent, l'implication des stéroïdes et des neurostéroïdes dans les MCDD a été évalué à l'état stable seulement, cependant, il est possible que ceux-ci ne soient influents qu'en situation dynamique. Cette étude avait pour objectif d'étudier cet état hormonal dynamique en comparant le retrait de progestérone à un état contrôle, de même que l'évaluation du rôle des métabolites 5 α -réduits dans cet état. Les résultats ont démontré qu'en effet, lors d'un retrait de progestérone, il y avait une diminution de

la capacité à recruter les MCDD. Ceux-ci pouvaient être rétablis par un pré-traitement avec de la finastéride qui empêchait la production, et du même coup, la fluctuation, des métabolites $3\alpha,5\alpha$ -réduits. Ceci suggérait fortement l'implication des neurostéroïdes dans cette diminution des capacités d'analgésie chez ces femmes. D'autre part, il a aussi été démontré que cette chute de progestérone était associée à une plasticité des sous-unités composant les récepteurs $GABA_A$ dans la moelle épinière et le tronc cérébral. En conclusion, l'implication du cycle menstruel dans la perception de la douleur chez les sujets sains, mais aussi chez les sujets atteints de pathologies douloureuses, est d'un grand intérêt. Cette étude a permis de pousser plus loin les hypothèses sur ces altérations de perceptions douloureuses chez ces sujets, suggérant de nouveaux mécanismes d'action liés à ce phénomène.

Progesterone withdrawal effect on descending modulation of pain involves neurosteroids

Marie-Andrée Coulombe^{1,2}, Isabelle Gaumont¹, Vincent Lelièvre², Pierrick Poisbeau², Serge Marchand¹

¹ Département de chirurgie, Service de neurochirurgie, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

² Centre National de la Recherche Scientifique et Université de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Département Nociception et Douleur, Strasbourg, France

Corresponding author

Serge Marchand

Service de neurochirurgie, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

3001, 12^e avenue Nord, Sherbrooke (Qc)

J1H 5N4 Canada

Serge.Marchand@USherbrooke.ca

Tel: +1 819 346-1110 ext 15889

Running title: ***Progesterone withdrawal effect on pain modulation***

Abstract

Symptoms of several pathologies are exacerbated during the perimenstrual phase. We previously demonstrated that sex hormones have a great influence on inhibitory descending controls. Neurosteroids are also involved in facilitatory descending controls. Since both inhibitory and facilitatory pain modulation system are closely related, the aim of this study was to evaluate the involvement of progesterone withdrawal (PWD) on inhibitory descending controls associated with a swim stress-induced analgesia (SSIA) and to evaluate the contribution of 5α -reduced metabolites in this dynamic hormonal state. We also evaluate the effect of PWD and neurosteroid depletion on gene expression, such as GABA-A subunits and chloride transporters, both important players in the nociceptive pathway. Female Sprague-Dawley rats followed a protocol of PWD or control injections (CTRL). Finasteride or vehicle was injected SC in order to inhibit neurosteroidogenesis. SSIA was induced with 10 min forced-swim stress at 22°C. Pain modulation was measured with calibrated forceps and hot plate test. PWD was associated with a decrease of SSIA. Finasteride inhibited the SSIA's decrease, which put forward the involvement of 5α -reduced metabolites in the observed effect. Both GABA receptor and chloride transporter expression was altered by the PWD protocol. The SSIA's modulation produced by the PWD protocol seems to be associated with the presence of 5α -reduced metabolites. It represents an improvement in our understanding of the role of sex hormones-related effect on descending inhibitory controls and their possible involvement in pain perception of healthy subjects and chronic pain sufferers.

Key words: Swim-stress, analgesia, progesterone withdrawal, neurosteroids, descending inhibitory controls; pain

Summary: Drop of progesterone levels decreases swim stress-induced analgesia, this effect involved 5α -reduced metabolites. Neuroactive steroids might be involved in variation of pain inhibition in women.

1. Introduction

Many research groups have observed the influence of menstrual cycle on pain perception. The first to measure this variation was Herren in 1933. He reported for the first time that nociceptive threshold during the premenstrual phase was decreased compared to other phases [33]. Procacci and Romano confirmed these observations in 1974. However, results concerning pain perception during menstrual cycle became less reproducible in the early 80's [51]. From a general point of view, most of these studies have shown increased nociceptive thresholds during the follicular phase or an increased sensitivity during the premenstrual/menstrual phase [51]. Moreover, it has been described that pain variation across the menstrual cycle is highly dependent on the modality of stimulation [51].

These studies are measuring pain threshold and tolerance without verifying the effect of the cycle on endogenous pain inhibitory mechanisms. In a recent study, we measured pain threshold/tolerance and diffuse noxious inhibitory control (DNIC, also called conditioned pain modulation, CPM) during three phases of the menstrual cycle of healthy women. We found that the DNIC was reduced during the perimenstrual phases compared to the ovulatory phase [57].

Sex steroids can be metabolized and transformed in many derived metabolites [20]. Interestingly, these metabolites, particularly 5α -reduced metabolites (often called neurosteroids/neuroactive steroids), do have many roles in the central nervous system by their binding to membrane receptors. The influence of sex steroids on pain is relatively well known, however, the one associated with their derived metabolites is still widely debated. The relationship between gonad-produced sex steroids and neuron-activating steroids is very close given the lipophilic properties of gonadal steroids allowing them to reach the central nervous system by crossing the blood-brain barrier. In fact, the peripheral concentration of steroids is directly correlated to the concentration of neurosteroids in the brain [8]. It has been shown that 5α -reduced metabolites, such as allopregnanolone, tetrahydrodeoxycorticosterone (THDOC), 5α -

diol, are involved in pain mechanisms through the modulation of neuronal excitability, especially at the spinal level [38; 46]. Steroids bind mainly to the GABA_A receptor which is highly sensitive to 3 α 5 α -reduced neurosteroids, but also to other receptors involved in pain modulation system [6; 27].

Several pain pathologies are overrepresented in women and the symptoms of those pathologies are often exacerbated during the perimenstrual phase [2; 35; 42; 47], a period when progesterone levels decline rapidly. Furthermore, clinical studies report the lack of descending inhibitory controls in a number of chronic pain pathologies [36; 53]. The aim of this study was to evaluate the involvement of a pharmacologically induced progesterone withdrawal on the efficacy of the inhibitory descending controls associated with a swim stress-induced analgesia (SSIA) and to evaluate the contribution of 5 α -reduced metabolites in this dynamic hormonal status. In order to characterize the mechanisms of action associated with progesterone withdrawal, we also explored the synaptic plasticity produced by a rapid progesterone variation. It has been shown that a progesterone withdrawal dosing protocol can accurately mimic the GABAergic neuronal plasticity observed during the late luteal phase [29; 30; 43].

2. Methods

2.1. Animals

Female Sprague-Dawley rats (Janvier, Le Genest St. Isle, France) were used in this study. Rats of same hormonal condition were housed in groups of three in a controlled environment facility (22°C, 55% of relative humidity, 12/12h light/dark cycle) with *ad libitum* access to food and water. The rats were habituated to handling and the testing apparatus before the period of testing in order to reduce the stress induced by the environment [1; 10]. All experiments were performed on 12 week-old rats, between 09:00 and 14:00 to reduce any variation related to circadian rhythm. All procedures were performed in accordance with the European Union Directive

2010/63/EU (September 22, 2010) on the use of animals in research. Legal approval to conduct these experiments was obtained from the French Department of Agriculture (License number 67-116 to PP) and procedures were approved by the regional ethic committee (AL/10/29/12/09). All efforts have been made to minimize the number of animals used and their suffering.

2.2. Behavioral testing

2.2.1. Drugs

To pharmacologically simulate late diestrus associated with a drop in progesterone levels, progesterone was injected (5 mg/kg in olive oil, IP) twice a day (at 07:30 and 17:30) for 6 days; an injection of vehicle (olive oil, IP) was then done at the 7th day [29]. The experimentations were conducted on the morning of the 8th day. Control animals received the vehicle during 7 consecutive days.

Finasteride treatment has been used to inhibit neurosteroidogenesis [22]. Rats were pretreated with finasteride (50 mg/kg: 10% v/v ethanol and olive oil, SC) or vehicle (10% v/v ethanol and olive oil, SC), four times in a period of 7 days (on even days, and on the day of experimentation, one hour before the testing).

Animals were divided into four groups: control protocol and vehicle treatment, CTRL_VEH; progesterone withdrawal protocol and vehicle treatment, PWD_VEH; control protocol and finasteride treatment, CTRL_FIN; progesterone withdrawal protocol and finasteride treatment PWD_FIN.

2.2.2. Mechanical nociceptive threshold

Calibrated forceps (Bioseb, Chaville, France) were used to measure mechanical nociceptive thresholds. The rats were previously acclimated and habituated to be loosely restrained in a towel. A force was gradually applied using the calibrated forceps on each hind paw. The pressure inducing the paw withdrawal

corresponded to the nociceptive threshold value. This manipulation was performed three times on each paw and the values were then averaged.

2.2.3. Thermal nociceptive threshold

A hot plate at fixed temperature (52°C, Bioseb, Chaville, France) was used to measure thermal nociceptive thresholds. The rats were previously acclimated and habituated to be placed on the hot plate at 30°C. The latency before the occurrence of the first licking behavior was noted.

2.2.4. Swim stress protocol

The forced-swim stress was carried out in a cylindrical opaque plastic container (about 40 cm diameter and 80 cm height). Escape from the container was impossible. The water temperature was monitored carefully by the experimenter and maintained at 22°C.

Baseline thresholds (mechanical and thermal) were obtained one hour after the injection of finasteride/vehicle (one hour before the forced swim). The mechanical nociceptive threshold was always measured before the thermal nociceptive threshold. One hour following the baseline threshold, rats were placed in the container filled with water and forced to swim for 10 minutes. At the end of the swim period, the rats were removed from the water, dried with a towel, and placed in a cage lined with paper towels to dry off. Mechanical and thermal thresholds were tested 3, 10, 40, 70, 180 minutes after the end of the swim.

2.3. RNA extraction and quantification of gene expression by real-time PCR

Four animals in each experimental group (CTRL_VEH; PWD_VEH; PWD_FIN) were used for quantitative polymerase chain reaction (PCR). Animals were sacrificed by decapitation; blood and central nervous system structures (brainstem and lumbar spinal cord) were collected and fast frozen on dry ice before storing at -80°C. Total RNA was extracted according to a protocol derived from the

original procedure of Chomczynski and Sacchi (1987), consisting of two independent total RNA extractions separated by a DNaseI treatment (DNA-free™ kit, Ambion), as previously described in detail [13; 41]. RNA quality and concentration were assessed by spectrophotometry and capillary electrophoresis on RNAsens biochips using Experion™ apparatus, according to the manufacturer's instructions (Biorad). Reverse transcription of the total RNA (800 ng) was done using the Iscript™ kit from Biorad. Negative controls (samples in which reverse transcriptase was omitted) were individually amplified by PCR using the different primer sets used in the present study to ensure the absence of genomic DNA contamination. To specifically amplify mRNA encoding for various rat proteins, we designed the specific primer sets (sense and antisense respectively) using Oligo6.0 and M-fold software for GABA_A receptor subunits δ and γ and KCC2 and NKCC1 chloride transporter. Primer sequences are given in Table 1.

Genes	<i>Primer Sequences</i> <i>(sense and reverse, respectively)</i>	<i>Amplicon</i> <i>(bp)</i>	<i>Spanning</i> <i>regions</i>	<i>NCBI</i> <i>Access</i>
GABA_A δ	5'-GCTGCCCTGGTGGAGTATG -3'OH 5'- CCTTGGCTTCGTGACCTTGAC-3'OH	96	1016-1102	NM017289
GABA_A γ	5'-AGGTCATGGAGGCTGTATCA -3'OH 5'-TCAGATCAAAGTACACGGACA -3'OH	109	694-806	NM183327
NKCC1	5' - GGGCCTCCTCACACGAAGAA -3'OH 5' TGAGGAGCCGAGGGTACTTCA - 3'OH	91	2047-2138	NM019229
KCC2	5'-ACTACAGCTGGCCACCTCGC -3'OH 5'-ATGCTGCCCTCAGAGAAACGC -3'OH	86	2507-2593	NM134363
HPRT	5'-TGGTGAAAAGGACCTCTCGAA-3'OH 5'-TCAAGGGCATATCCAACAACA-3'OH	99	637-727	NM013556

Table 1.

Sequences of oligonucleotidic primers and their theoretical spanning regions of published genes from NCBI database used in the quantitative PCR. Quantification of the relative expression of the above genes of interest was made using HPRT, which was found to remain highly stable among the different treatments, and was subsequently used as standard for quantification.

2.4. Data analyzes

All statistical analyzes were done using GraphPad Prism version 5.04 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

2.4.1. Baseline thresholds

The Shapiro-Wilk normality test has allowed us to assess the distribution of our sample. Since all groups were normally distributed, a one-way ANOVA was used to compare means with a Bonferroni *post-hoc* test to compare selected pairs (CTRL_VEH vs. PWD_VEH; CTRL_VEH vs. CTRL_FIN; PWD_VEH vs. PWD_FIN).

2.4.2. Measure of analgesia

Nociceptive responses were analysed using a two-way ANOVA. Post-swim analgesia was expressed as a percentage of the maximum possible effect (%MPE), as calculated by the following formula [40]: $\%MPE = (\text{postswim threshold} - \text{baseline threshold}) / (\text{maximal possible response} - \text{baseline threshold}) \times 100$. The peaks of analgesia (10 minutes following the stress) were compared as means. Since all our samples were normally distributed, a one-way ANOVA was used to compare means with a Bonferroni *post-hoc* test to compare selected pairs (CTRL_VEH vs. PWD_VEH; CTRL_VEH vs. CTRL_FIN; PWD_VEH vs. PWD_FIN).

2.4.3. RNA quantification

Gene expression was quantified relatively to HPRT gene (gene coding for hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, a housekeeping gene). Every measure was quantified in duplicate. Means were compared using one-way ANOVA test with Bonferroni *post-hoc* test for selected pairs (CTRL_VEH vs. PWD_VEH; PWD_VEH vs. PWD_FIN; CTRL_VEH vs. CTRL_FIN).

3. Results

Nociceptive thresholds were compared between groups using non-parametric statistics. No significant difference was observed (Figure 1, Calibrated forceps. Kruskal-Wallis Test, $p = 0.03$, KW statistic 9.922, CTRL_VEH vs. PWD_VEH: $p = 0.22$, mean rank difference: 8.403; PWD_VEH vs. PWD_FIN: $p > 0.999$, mean rank difference: -0.667; CTRL_VEH vs. CTRL_FIN: $p > 0.999$, mean rank difference: -3.661).

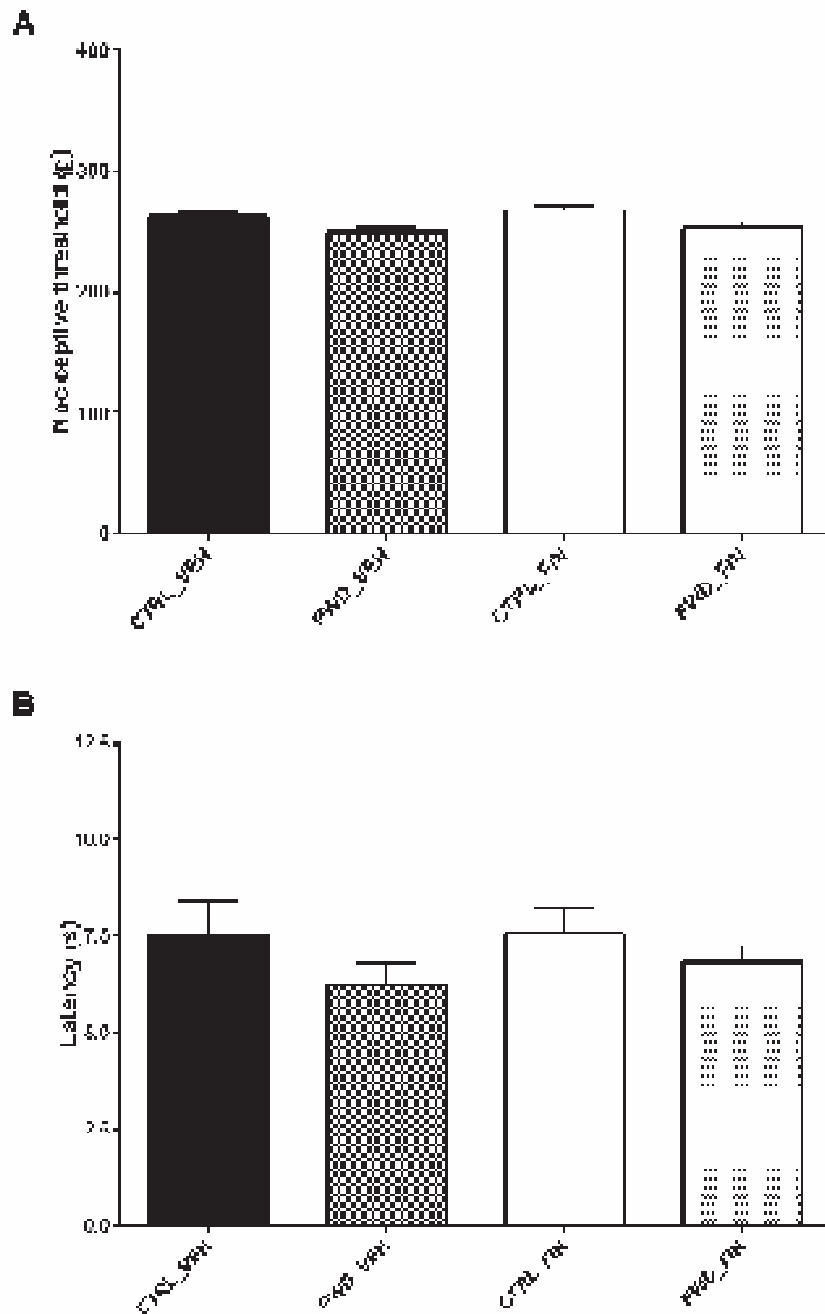


Figure 1.

Nociceptive mechanical threshold and thermal hot latency measured with the calibrated forceps (A) and hot plate test at 52°C (B). No significant difference was observed. Data are expressed as means \pm SEM. Statistical analyzes were done using a one-way ANOVA followed by a Bonferroni *post-hoc* test for selected pairs.

The stress-induced analgesia was compared between female rats with progesterone withdrawal and those receiving control injections for 8 days using a two-way ANOVA (figure 2). The progesterone withdrawal induced an important decrease of the nociceptive response compared with control females (Interaction: $F_{5,80}:9.004$, $p < 0.0001$; Time: $F_{5,80}:75.15$, $p < 0.0001$; Treatment: $F_{1,16}:13.45$, $p = 0.0021$); it takes a higher stimulus to produce a nociceptive response (figure 2A). This difference was present during the first 10 minutes post swim (figure 2A, CTRL_VEH vs. PWD_VEH: DF=96, time -10: $t = 0.5680$, $p > 0.05$; time 3: $t = 5.603$, $p < 0.0001$; time 10: $t = 5.353$, $p < 0.0001$; time 45: $t = 2.234$, $p > 0.05$; time 60: $t = 0.8377$, $p > 0.05$; time 180: $t = 0.2181$, $p > 0.05$).

The influence of 5α -reduced metabolites was evaluated using finasteride injections for 7 days (see methods) before any testing (figure 2B). Comparison of nociceptive responses of vehicle- and finasteride –pretreated groups was done using a two-way ANOVA (Interaction: $F(5, 80):9.179$, $p < 0.0001$; Time: $F_{5,80}:83.48$, $p < 0.0001$; Treatment: $F_{1,16}:6.292$, $p = 0.023$). Also, a one-way ANOVA for the analysis of %MPE histograms was done followed by a Bonferroni post-hoc test for selected pairs (CTRL_VEH vs. PWD_VEH; CTRL_VEH vs. CTRL_FIN; PWD_VEH vs. PWD_FIN). The results show that the reduction of SSIA in PWD females receiving the vehicle was no longer present in finasteride pre-treated females (figure 2B, PWD_VEH vs. PWD_FIN: DF=96, time -10: $t = 0.1716$, $p > 0.05$; time 3: $t = 5.046$, $p < 0.0001$; time 10: $t = 4.506$, $p < 0.001$; time 45: $t = 0.6138$, $p > 0.05$; time 60: $t = 0.5433$, $p > 0.05$; time 180: $t = 0.3534$, $p > 0.05$; figure 2C, CTRL_VEH: $22 \pm 2\%$ vs. PWD_VEH: $12 \pm 2\%$, $t = 4.045$, $p < 0.01$; PWD_VEH $12 \pm 2\%$ vs. PWD_FIN $22 \pm 2\%$, $t = 3.6171$, $p < 0.01$; CTRL_VEH $22 \pm 2\%$ vs. CTRL_FIN $17 \pm 1\%$, $t = 2.064$, $p > 0.05$).

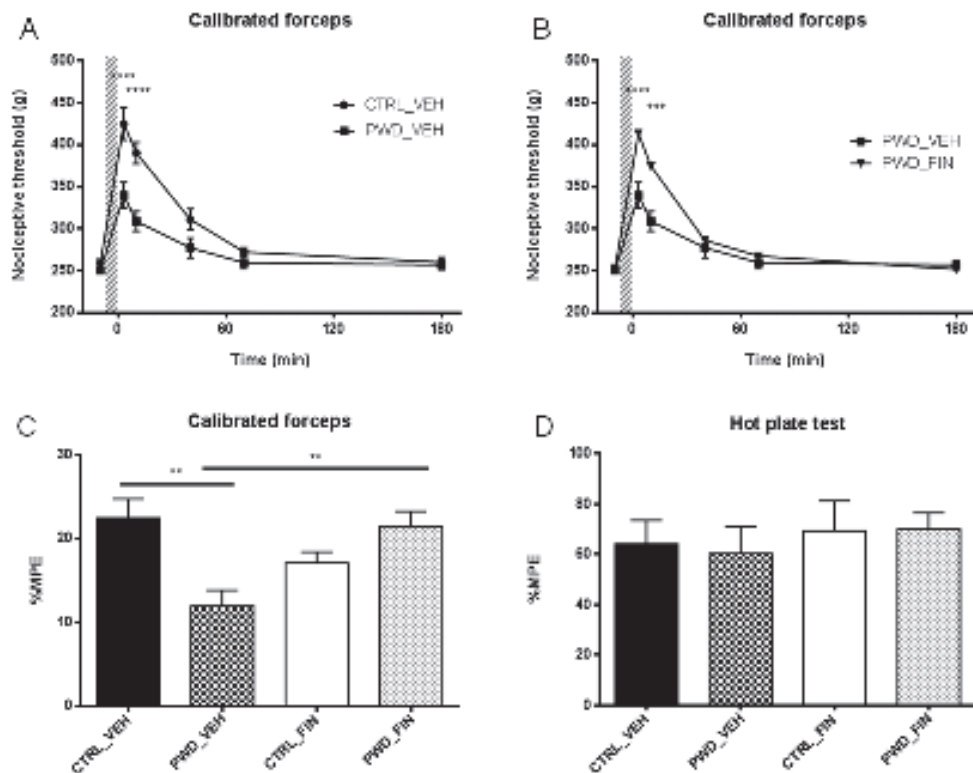


Figure 2.

Time course of mechanical nociceptive responses comparing control female rats (vehicle-treated) and females in progesterone withdrawal (PWD) (A) and PWD females receiving vehicle or finasteride treatment (B). Histograms illustrating the amplitude of analgesia 3 minutes post-swim stress, expressed as a percentage of the maximal possible effect (%MPE) while measuring pressure thresholds measured with the calibrated forceps (C) and thermal hot latencies for paw licking with the hot plate test at 52°C (D). PWD_VEH rats had a lower SSIA compared to CTRL_VEH rats. Finasteride treatment restored the SSIA in PWD females. Data are expressed as means \pm SEM. Statistical analyzes were performed using a two-way ANOVA (A,B) and a one-way ANOVA (C,D) followed by a Bonferroni post-hoc test for selected pairs. **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$;****: $p < 0.0001$

Since 5 α -reduced steroids are potent modulators of GABA_A receptor-mediated inhibition in the central nervous system, we characterized the possible effects of PWD on the expression of two key GABA_A receptor subunits (delta- δ and gamma- γ) and of the chloride cotransporters NKCC1 and KCC2 in the rat spinal cord and brainstem. Relative gene expression of every group was compared using one-way ANOVA and followed by Bonferroni *post-hoc* analysis for selected pairs (CTRL_VEH vs PWD_VEH; PWD_VEH vs PWD_FIN).

GABA_A δ subunit expression was not significantly different between group but γ subunit expression was increased in the spinal cord following progesterone withdrawal (figure 3A, CTRL_VEH: 0.29 ± 0.02 vs. PWD_VEH: 0.45 ± 0.02 , $p < 0.01$; PWD_VEH: 0.45 ± 0.02 vs. PWD_FIN: 0.20 ± 0.02 , $p < 0.0001$). This modulation resulted in a decrease of the δ/γ ratio in the spinal cord of PWD females (figure 3B, CTRL_VEH: 0.023 ± 0.002 vs. PWD_VEH: 0.0113 ± 0.0003 , $p < 0.01$; PWD_VEH: 0.0113 ± 0.0003 vs. PWD_FIN: 0.033 ± 0.002 , $p < 0.0001$).

In contrast, the brainstem expression of δ subunit, but not of γ subunit, was decreased in PWD females (figure 3C, CTRL_VEH 0.018 ± 0.002 vs. PWD_VEH 0.0049 ± 0.0005 , $p < 0.01$; PWD_VEH 0.0049 ± 0.0005 vs. PWD_FIN 0.018 ± 0.003 , $p < 0.01$). As for the spinal cord, a decrease of the δ/γ ratio was observed in PWD females (figure 3B, CTRL_VEH: 0.07 ± 0.01 vs. PWD_VEH: 0.019 ± 0.004 , $p < 0.01$; PWD_VEH: 0.019 ± 0.004 vs. PWD_FIN: 0.06 ± 0.01 , $p < 0.05$). These changes seemed highly dependent of 5 α -reduced steroids presence since the δ/γ ratio was reversed in females treated with finasteride.

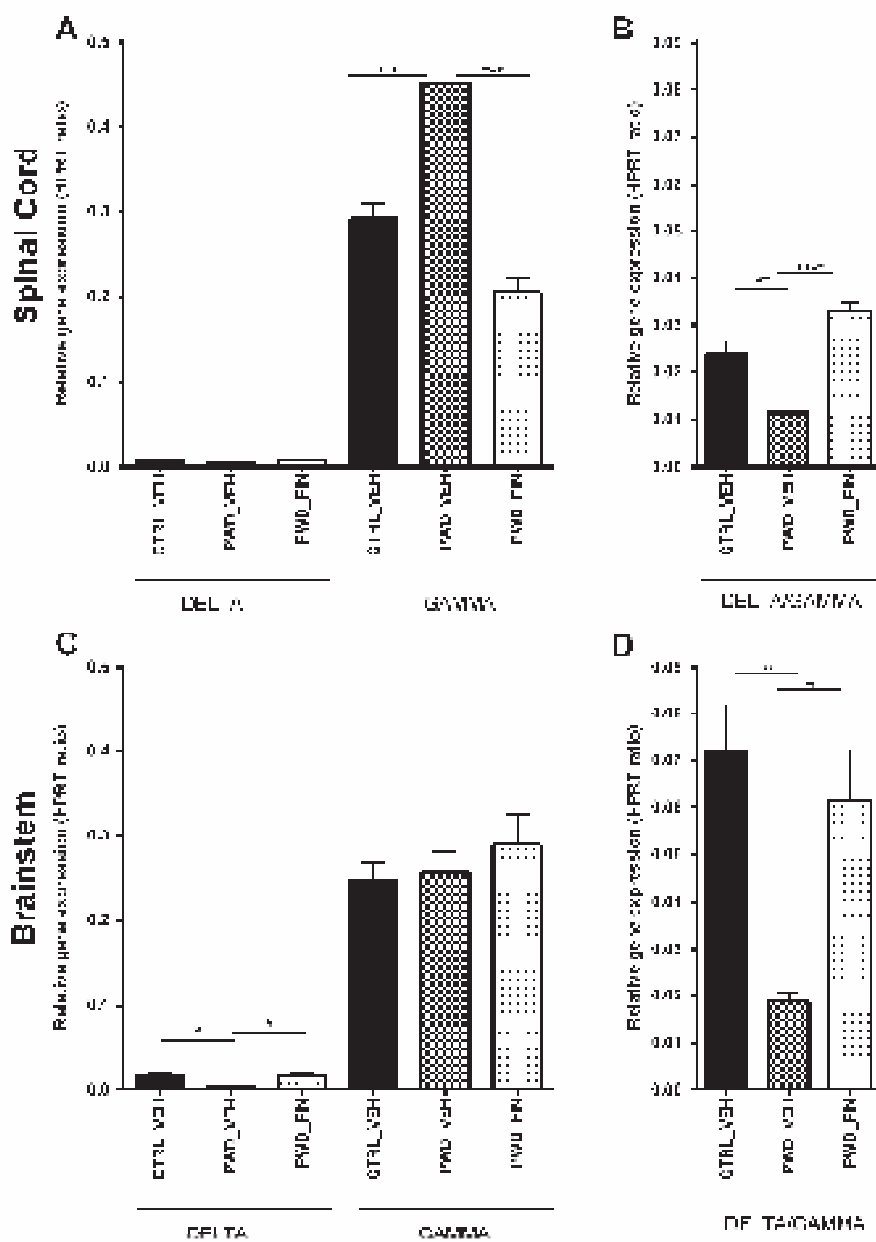


Figure 3.

Histograms illustrating the expression of GABA_A receptor subunits (δ and γ) in the spinal cord (A-B) and in the brainstem (C-D) of control female rats (CTRL-VEH), female rats in progesterone withdrawal pre-treated with finasteride (PWD-FIN) or its vehicle (PWD_VEH). Expression ratios are also shown for GABA_AR subunits (B-D). Data are expressed as means \pm SEM. Statistical analyzes were done using a one-way ANOVA followed by a Bonferroni *post-hoc* test for selected pairs. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$.

We found few changes in the expression of NKCC1 in the spinal cord and the brainstem (figure 4A-C). NKCC1 levels in the spinal cord were significantly reduced in finasteride-pretreated animals compared to vehicle (figure 4A, PWD_VEH 0.13 ± 0.02 vs. PWD_FIN 0.066 ± 0.006 , $p < 0.001$). In addition, no variation of KCC2 expression was noticed in the spinal cord (figure 4A). This cotransporter gene was also overexpressed in the brainstem of PWD females (Figure 4C, CTRL_VEH 0.51 ± 0.02 vs. PWD_VEH 0.79 ± 0.05 , $p < 0.001$). As illustrated in figure 4, this change was abolished in the brainstem of finasteride-pretreated females. Together, NKCC1/KCC2 expression ratio was thus elevated compared to control females and to finasteride-pretreated PWD females (figure 4D, CTRL_VEH 0.068 ± 0.004 vs. PWD_VEH 0.105 ± 0.005 , $p < 0.001$; PWD_VEH 0.105 ± 0.005 vs. PWD_FIN 0.039 ± 0.004 , $p < 0.0001$).

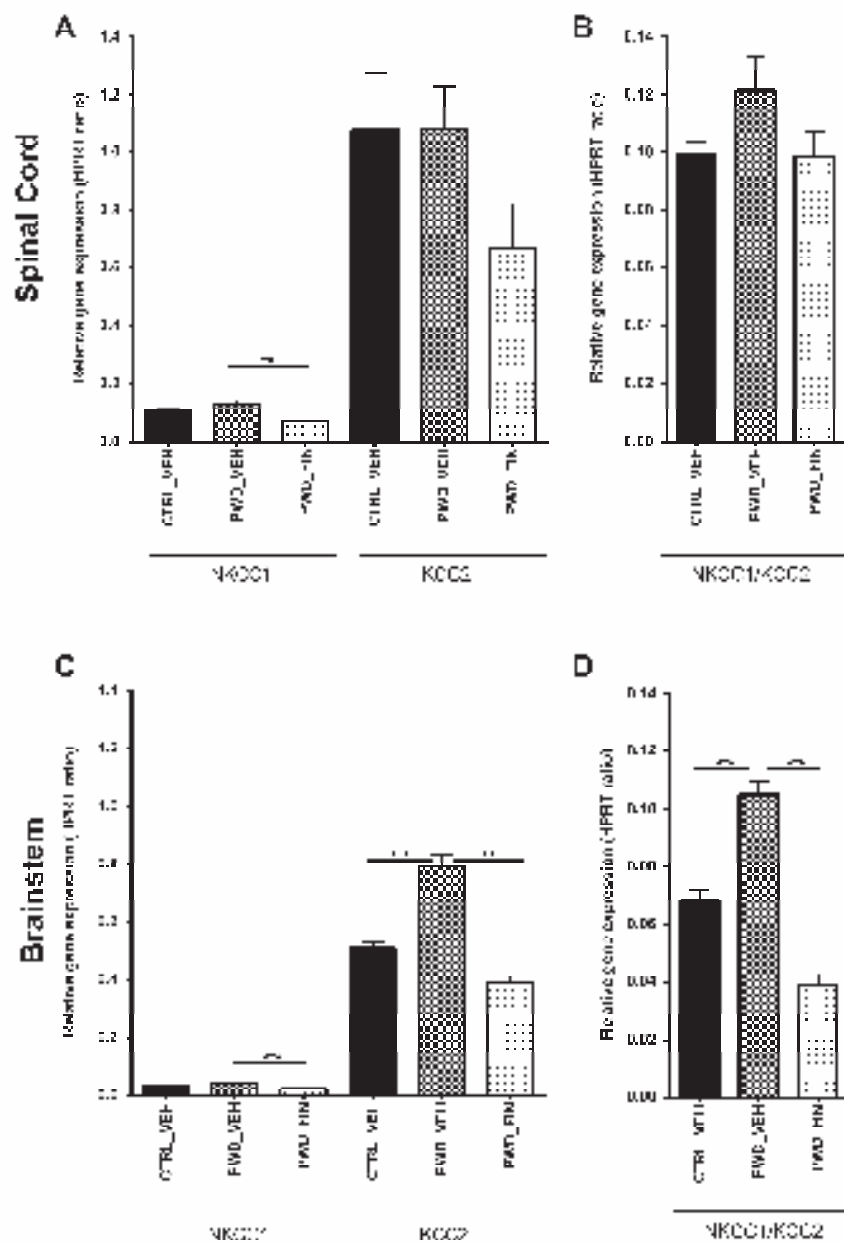


Figure 4.

Histograms illustrating the expression of chloride cotransporters (NKCC1, KCC2) in the spinal cord (A-B) and in the brainstem (C-D) of control female rats (CTRL-VEH), female rats in progesterone withdrawal pre-treated with finasteride (PWD-FIN) or its vehicle (PWD-VEH). Expression ratios are also shown transporters (B-D). Data are expressed as means \pm SEM. Statistical analyzes were done using a one-way ANOVA followed by a Bonferroni *post-hoc* test for selected pairs., **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

4. Discussion

Our results show that progesterone withdrawal (PWD), which has been described as representative of the late luteal phase of the menstrual cycle, induces a decrease in the efficacy of inhibitory pain controls associated with stress-induced analgesia (SSIA). Injections of the 5α reductase inhibitor finasteride in PWD rats underline the involvement of 5α -reduced metabolites in the modulation of SIA. As demonstrated previously, injections of finasteride had no effect on SIA of CTRL rats [15]. Moreover, quantitative PCR highlighted the plasticity of GABA_A receptor subunits δ and γ , and also chloride co-transporters NKCC1 and KCC2 in the spinal cord and the brainstem following this hormonal variation.

The influence of estrogens and progesterone on pain mechanisms has been studied from several angles [16; 25; 26; 55; 56]. Variations in the efficacy of diffuse noxious inhibitory controls were, for example, noted in healthy women during the menstrual cycle [57]. This suggested an increased efficacy of endogenous pain inhibitory mechanism during ovulation, a period associated with high plasmatic levels estradiol and LH. Alternatively, an increase in pain symptoms during the luteal phase is often observed and might correlates with a decrease in the efficacy of endogenous pain inhibitory mechanisms.

Gonadal hormones, through their binding to estrogen receptors (ER α and ER β) and progesterone receptor (PR), are involved in the expression of many neurotransmitters, enzymes and receptors in the central nervous system. It has been shown that, in the case of estrogens, ER α and ER β may act differentially on the mechanisms of pain perception [16]. It is well known that estradiol can modulate several neurotransmitters; however, its effect on the expression of opioid peptides seems to be the most potent. Indeed, it has been shown that elevated levels of estrogens are associated with mu opioid receptor availability and a greater activation of endogenous opioid neurotransmission, whereas low levels of estrogens appear to induce a reduction in the endogenous opioid tone [55]. It is suggesting that chronic

pain conditions in women could be modulated by the high versus low level of gonadal hormones which can increase or decrease the efficacy of descending modulation of pain.

In the present experiments, we used a PWD protocol well described in literature and compared them to non-hormonally treated rats. The difference observed between high progesterone and progesterone withdrawal has been largely described [17; 18; 43]. Considering that high levels of progesterone are only seen in the luteal phase, we choose to use vehicle injection for the control group instead of high progesterone treatment. We report a decrease in analgesia produced by a forced-swim stress during progesterone withdrawal. This result can be compared with the increase in pain symptoms observed in women during the luteal phase in the study of Tousignant-Laflamme & Marchand (2009), and thus, could be associated with a decrease of endogenous pain inhibitory mechanisms efficacy.

Moreover, reversal of the PWD effect obtained with finasteride-pretreatment showed a clear implication of 5α -reduced metabolites in the efficacy of stress-induced analgesia. It is well known that stress-induced analgesia involved mostly descending modulation of pain [9]. Consequently, this experiment strongly suggested the involvement of 5α -reduced metabolites in descending controls of pain. Our results allow us to extrapolate and to suggest the possible involvement of neuroactive steroids in the cyclic variation of the amplitude of the diffuse noxious inhibitory controls in healthy women. 5α -reduced metabolites were associated with antinociceptive responses in several pain models [3; 11; 23; 45]. Their effects have been demonstrated on spinal pain processing and are mediated by the potentiation of GABAergic inhibition [32; 38; 46]. Other receptors have also been proposed (NMDA, $5HT_3$, voltage-gated channel, sigma 1, and others) [20; 52].

The involvement of GABAergic neurons in descending modulation of pain has not been extensively studied [4]. However, some experiments have demonstrated

a paradoxical role of GABA in the brainstem where GABAergic neurons of spinal and supraspinal networks have a very distinct implication in pain processing. In fact, although the GABAergic neurons of the brainstem seem to be pronociceptive [4; 12; 28; 31; 49; 50], the involvement of GABAergic interneurons in the spinal cord reduce the transmission of nociceptive information and produce a global antinociceptive effect [17; 19; 37; 44; 58].

In order to characterize the mechanisms of action associated with progesterone withdrawal, we explored the synaptic plasticity produced by a rapid progesterone variation. We quantified the expression of some important players in chloride homeostasis, such as GABA_A receptor subunits δ and γ and chloride co-transporter NKCC1 and KCC2. In the spinal cord, our first observation was the increase of GABA_A receptor containing γ subunits. This particular subunit confers the benzodiazepine sensitivity and is associated with synaptic and extrasynaptic receptors, thus contributing to phasic (synaptic) and tonic (extrasynaptic) inhibition produced by GABAergic interneurons of the spinal cord. This subunit of GABA_A receptor is less affected by 5 α -reduced metabolites compared to GABA_A receptors containing δ subunits [5]. In the brainstem, our results show a decrease in δ subunit in addition to a clear increase of chloride transporter KCC2. The δ subunit of GABA_A receptor is found almost exclusively at extrasynaptic sites [21; 39]. It contributes to the tonic neuronal inhibition and confers to GABA_A receptors a high sensitivity to 3 α 5 α -reduced metabolites [5]. On the other hand, KCC2 is in charge of chloride ions extrusion of the cell and warrants optimal neuronal inhibition through membrane voltage hyperpolarization [48]. Decrease in expression of delta subunit of GABA_A receptor in withdrawal situation has been previously observed [7; 29]. In agreement with our results, Biggio and collaborators (2006) showed in primary cultures of rat cerebellar granule cells. that in vitro progesterone withdrawal decreased GABA_A subunit δ mRNAs, a condition that was restored by co-administration of finasteride with the progesterone withdrawal procedure [7]. On the other hand, Griffiths and

Lovick (2005) observed an increased labeling of δ subunit in periaqueductal gray (PAG) cells of rats withdrawn from progesterone [29]. Beside possible difference related to the model and techniques used, these results must be interpreted with caution.

It has been described that GABA_A receptor function can be greatly influenced by the local homeostasis in neurosteroids concentration. In accordance with this assumption, perturbation of hormonal concentration could easily be responsible for variation of subunit expression, receptor composition and their subsequent modulation by endogenous modulators [32]. The only consideration of the decreased expression of GABA_A receptor subunits cannot be interpreted as is; for example, the neurosteroid potentiation of δ subunit containing GABA_A receptors will highly rely on the chloride gradient homeostasis in neurons [54].

Our results suggest an alteration of chloride homeostasis in the brainstem. Increased expression of KCC2 co-transporter could amplify/optimize the inward chloride gradient during GABA channel opening and, even with a smaller expression of δ subunits, it could possibly increased the GABAergic tone in the brainstem. As described earlier, an increase in GABAergic tone at this brain level may induce pronociceptive effect. One should keep in mind that these changes in the brainstem could also influence other descending controls such as oxytocin associated descending control of pain [14]. Hewitt and collaborators have also suggested that the disruption of chloride homeostasis could alter the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) following a stress [34]. Finally, it is known that gene expression of the KCC2 transporter is highly sexually dimorphic [24], and could hypothetically be involved in the low men/women ratio observed in some chronic pain pathologies.

As mentioned earlier, many chronic pain conditions involved deficiency of descending inhibitory controls and many of these pathologies have exacerbated

symptoms during the perimenstrual phase. For example, Anderberg and collaborators (1998) described the exacerbation of pain and affective symptoms during the luteal and the premenstrual phase of subjects with fibromyalgia syndrome compared to healthy controls [2]. These results could suggest the involvement of 5α -reduced metabolites in pain and affective symptoms of these chronic pain pathologies. Moreover, it put forward the importance of steroids and of chloride homeostasis in the supraspinal structures of the central nervous system and their possible involvement in descending circuit involving the periaqueductal gray (PAG), the rostroventral medulla (RVM) and the spinal cord, the oxytocine descending system involving projections from the paraventricular nucleus to the spinal cord, and finally, the hypothalamo-pituitary-adrenal axis (HPA).

In summary, our data illustrate the influence of progesterone withdrawal on pain inhibitory descending controls efficacy associated with SSIA. Progesterone withdrawal significantly reduced analgesia evoked by the forced swim stress, and this effect was strongly related to 5α -reduced neurosteroid metabolites. Since we also observed an associated molecular plasticity of some GABA_A receptor subunits and of chloride transporters, our working hypothesis put forward a dynamic modulation of GABAergic inhibition in the brainstem and spinal cord of female during progesterone withdrawal. At this stage, the contribution of GABAergic neuronal network in shaping descending controls of pain remain unclear, especially during dynamic hormonal variations and will require further investigations. Finally, it would be of great interest to translate our results to clinical research, particularly in a population of patients with idiopathic pain syndromes.

Acknowledgments

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Institut Universitaire de France. MA Coulombe holds a doctoral research award from the Canadian Institute of Health Research (CIHR). Dr Marchand is a supported member of the Centre de recherche clinique Étienne-Le Bel of the Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke. Dr Marchand holds grants from the CIHR.

Reference

- [1] Abbott FV, Franklin KB, Connell B. The stress of a novel environment reduces formalin pain: possible role of serotonin. *Eur J Pharmacol* 1986;126(1-2):141-144.
- [2] Anderberg UM, Marteinsdottir I, Hallman J, Backstrom T. Variability in Cyclicity Affects Pain and Other Symptoms In Female Fibromyalgia Syndrome Patients. *J Musculoskeletal Pain* 1998;6(4):5-22.
- [3] Aouad M, Charlet A, Rodeau JL, Poisbeau P. Reduction and prevention of vincristine-induced neuropathic pain symptoms by the non-benzodiazepine anxiolytic etifoxine are mediated by 3alpha-reduced neurosteroids. *Pain* 2009;147(1-3):54-59.
- [4] Behbehani MM, Jiang MR, Chandler SD, Ennis M. The effect of GABA and its antagonists on midbrain periaqueductal gray neurons in the rat. *Pain* 1990;40(2):195-204.
- [5] Belelli D, Casula A, Ling A, Lambert JJ. The influence of subunit composition on the interaction of neurosteroids with GABA(A) receptors. *Neuropharmacology* 2002;43(4):651-661.
- [6] Belelli D, Lambert JJ. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nat Rev Neurosci* 2005;6(7):565-575.
- [7] Biggio F, Gorini G, Caria S, Murru L, Mostallino MC, Sanna E, Follesa P. Plastic neuronal changes in GABA(A) receptor gene expression induced by progesterone metabolites: in vitro molecular and functional studies. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;84(4):545-554.
- [8] Bixo M, Andersson A, Winblad B, Purdy RH, Backstrom T. Progesterone, 5alpha-pregnane-3,20-dione and 3alpha-hydroxy-5alpha-pregnane-20-one in specific regions of the human female brain in different endocrine states. *Brain Res* 1997;764(1-2):173-178.
- [9] Butler RK, Finn DP. Stress-induced analgesia. *Prog Neurobiol* 2009;88(3):184-202.
- [10] Capone F, Aloisi AM. Refinement of pain evaluation techniques. The formalin test. *Ann Ist Super Sanita* 2004;40(2):223-229.
- [11] Charlet A, Lasbennes F, Darbon P, Poisbeau P. Fast non-genomic effects of progesterone-derived neurosteroids on nociceptive thresholds and pain symptoms. *Pain* 2008;139(3):603-609.
- [12] Cho HJ, Basbaum AI. GABAergic circuitry in the rostral ventral medulla of the rat and its relationship to descending antinociceptive controls. *J Comp Neurol* 1991;303(2):316-328.
- [13] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162(1):156-159.
- [14] Condes-Lara M, Rojas-Piloni G, Martinez-Lorenzana G, Lopez-Hidalgo M, Rodriguez-Jimenez J. Hypothalamospinal oxytocinergic antinociception is mediated by GABAergic and opiate neurons that reduce A-delta and C fiber primary afferent excitation of spinal cord cells. *Brain Res* 2009;1247:38-49.

- [15] Coulombe MA, Marchand S, Poisbeau P. Relationship between gonadal steroids and neurosteroids in modulation of stress-induced analgesia. In: GC Panzica, S Gotti editors, *Proceedings of the 6th International Meeting: Steroids and Nervous System*. Madrid, 2011.
- [16] Coulombe MA, Spooner MF, Gaumond I, Carrier JC, Marchand S. Estrogen receptors beta and alpha have specific pro- and anti-nociceptive actions. *Neuroscience* 2011;184:172-182.
- [17] Devall AJ, Liu ZW, Lovick TA. Hyperalgesia in the setting of anxiety: sex differences and effects of the oestrous cycle in Wistar rats. *Psychoneuroendocrinology* 2009;34(4):587-596.
- [18] Devall AJ, Lovick TA. Differential activation of the periaqueductal gray by mild anxiogenic stress at different stages of the estrous cycle in female rats. *Neuropsychopharmacology* 2010;35(5):1174-1185.
- [19] Dirig DM, Yaksh TL. Intrathecal baclofen and muscimol, but not midazolam, are antinociceptive using the rat-formalin model. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;275(1):219-227.
- [20] Dubrovsky BO. Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005;29(2):169-192.
- [21] Farrant M, Nusser Z. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* 2005;6(3):215-229.
- [22] Finn DA, Beadles-Bohling AS, Beckley EH, Ford MM, Gililand KR, Gorin-Meyer RE, Wiren KM. A new look at the 5alpha-reductase inhibitor finasteride. *CNS Drug Rev* 2006;12(1):53-76.
- [23] Frye CA, Duncan JE. Progesterone metabolites, effective at the GABAA receptor complex, attenuate pain sensitivity in rats. *Brain Res* 1994;643(1-2):194-203.
- [24] Galanopoulou AS. Sexually dimorphic expression of KCC2 and GABA function. *Epilepsy Res* 2008;80(2-3):99-113.
- [25] Gaumond I, Arsenault P, Marchand S. The role of sex hormones on formalin-induced nociceptive responses. *Brain Res* 2002;958(1):139-145.
- [26] Gaumond I, Arsenault P, Marchand S. Specificity of female and male sex hormones on excitatory and inhibitory phases of formalin-induced nociceptive responses. *Brain Res* 2005;1052(1):105-111.
- [27] Gee KW. Steroid modulation of the GABA/benzodiazepine receptor-linked chloride ionophore. *Mol Neurobiol* 1988;2(4):291-317.
- [28] Gilbert AK, Franklin KB. GABAergic modulation of descending inhibitory systems from the rostral ventromedial medulla (RVM). Dose-response analysis of nociception and neurological deficits. *Pain* 2001;90(1-2):25-36.
- [29] Griffiths J, Lovick T. Withdrawal from progesterone increases expression of alpha4, beta1, and delta GABA(A) receptor subunits in neurons in the periaqueductal gray matter in female Wistar rats. *J Comp Neurol* 2005;486(1):89-97.

- [30] Griffiths JL, Lovick TA. GABAergic neurones in the rat periaqueductal grey matter express alpha4, beta1 and delta GABAA receptor subunits: plasticity of expression during the estrous cycle. *Neuroscience* 2005;136(2):457-466.
- [31] Heinricher MM, Kaplan HJ. GABA-mediated inhibition in rostral ventromedial medulla: role in nociceptive modulation in the lightly anesthetized rat. *Pain* 1991;47(1):105-113.
- [32] Herd MB, Belelli D, Lambert JJ. Neurosteroid modulation of synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors. *Pharmacol Ther* 2007;116(1):20-34.
- [33] Herren RGH. The effect of high and low female sex hormone concentration on the two-point threshold of pain and touch and upon tactile sensitivity. *J Exp Psychol* 1933;16:324-327.
- [34] Hewitt SA, Wamsteeker JJ, Kurz EU, Bains JS. Altered chloride homeostasis removes synaptic inhibitory constraint of the stress axis. *Nat Neurosci* 2009;12(4):438-443.
- [35] Houghton LA, Lea R, Jackson N, Whorwell PJ. The menstrual cycle affects rectal sensitivity in patients with irritable bowel syndrome but not healthy volunteers. *Gut* 2002;50(4):471-474.
- [36] Julien N, Goffaux P, Arsenault P, Marchand S. Widespread pain in fibromyalgia is related to a deficit of endogenous pain inhibition. *Pain* 2005;114(1-2):295-302.
- [37] Kaneko M, Hammond DL. Role of spinal gamma-aminobutyric acidA receptors in formalin-induced nociception in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;282(2):928-938.
- [38] Keller AF, Breton JD, Schlichter R, Poisbeau P. Production of 5alpha-reduced neurosteroids is developmentally regulated and shapes GABA(A) miniature IPSCs in lamina II of the spinal cord. *J Neurosci* 2004;24(4):907-915.
- [39] Lambert JJ, Cooper MA, Simmons RDJ, Weir CJ, Belelli D. Neurosteroids: endogenous allosteric modulators of GABA(A) receptors. *Psychoneuroendocrinology* 2009;34 Suppl:S48-S58.
- [40] LeBars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 2001;53(4):597-652.
- [41] Lelievre V, Hu Z, Byun JY, Ioffe Y, Waschek JA. Fibroblast growth factor-2 converts PACAP growth action on embryonic hindbrain precursors from stimulation to inhibition. *J Neurosci Res* 2002;67(5):566-573.
- [42] LeResche L, Mancl L, Sherman JJ, Gandara B, Dworkin SF. Changes in temporomandibular pain and other symptoms across the menstrual cycle. *Pain* 2003;106(3):253-261.
- [43] Lovick TA, Devall AJ. Progesterone withdrawal-evoked plasticity of neural function in the female periaqueductal grey matter. *Neural Plast* 2009;2009:730902.
- [44] Nadeson R, Guo Z, Porter V, Gent JP, Goodchild CS. gamma-Aminobutyric acidA receptors and spinally mediated antinociception in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;278(2):620-626.

- [45] Pathirathna S, Todorovic SM, Covey DF, Jevtovic-Todorovic V. 5alpha-reduced neuroactive steroids alleviate thermal and mechanical hyperalgesia in rats with neuropathic pain. *Pain* 2005;117(3):326-339.
- [46] Poisbeau P, Patte-Mensah C, Keller AF, Barrot M, Breton JD, Luis-Delgado OE, Freund-Mercier MJ, Mensah-Nyagan AG, Schlichter R. Inflammatory pain upregulates spinal inhibition via endogenous neurosteroid production. *J Neurosci* 2005;25(50):11768-11776.
- [47] Powell-Boone T, Ness TJ, Cannon R, Lloyd LK, Weigent DA, Fillingim RB. Menstrual cycle affects bladder pain sensation in subjects with interstitial cystitis. *J Urol* 2005;174(5):1832-1836.
- [48] Price TJ, Cervero F, Gold MS, Hammond DL, Prescott SA. Chloride regulation in the pain pathway. *Brain Res Rev* 2009;60(1):149-170
- [49] Reichling DB, Basbaum AI. Contribution of brainstem GABAergic circuitry to descending antinociceptive controls: I. GABA-immunoreactive projection neurons in the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus. *J Comp Neurol* 1990;302(2):370-377.
- [50] Reichling DB, Basbaum AI. Contribution of brainstem GABAergic circuitry to descending antinociceptive controls: II. Electron microscopic immunocytochemical evidence of GABAergic control over the projection from the periaqueductal gray to the nucleus raphe magnus in the rat. *J Comp Neurol* 1990;302(2):378-393.
- [51] Riley JL, Robinson ME, Wise EA, Price DD. A meta-analytic review of pain perception across the menstrual cycle. *Pain* 1999;81(3):225-235.
- [52] Rupprecht R. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. *Psychoneuroendocrinology* 2003;28(2):139-168.
- [53] Seifert F, Kiefer G, DeCol R, Schmelz M, Maihofner C. Differential endogenous pain modulation in complex-regional pain syndrome. *Brain* 2009;132(Pt 3):788-800.
- [54] Shen H, Gong QH, Aoki C, Yuan M, Ruderman Y, Dattilo M, Williams K, Smith SS. Reversal of neurosteroid effects at alpha4beta2delta GABAA receptors triggers anxiety at puberty. *Nat Neurosci* 2007;10(4):469-477.
- [55] Smith YR, Stohler CS, Nichols TE, Bueller JA, Koeppe RA, Zubieta J-K. Pronociceptive and antinociceptive effects of estradiol through endogenous opioid neurotransmission in women. *J Neurosci* 2006;26(21):5777-5785.
- [56] Spooner MF, Robichaud P, Carrier JC, Marchand S. Endogenous pain modulation during the formalin test in estrogen receptor beta knockout mice. *Neuroscience* 2007;150(3):675-680.
- [57] Tousignant-Laflamme Y, Marchand S. Excitatory and inhibitory pain mechanisms during the menstrual cycle in healthy women. *Pain* 2009;146(1-2):47-55.
- [58] Yamamoto T, Yaksh TL. Effects of intrathecal strychnine and bicuculline on nerve compression-induced thermal hyperalgesia and selective antagonism by MK-801. *Pain* 1993;54(1):79-84.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce projet de thèse visait à mieux comprendre les différences de perception de la douleur entre les hommes et les femmes ainsi que les multiples facteurs impliqués dans cette différence entre les sexes. Comme il a été décrit dans l'introduction, cette différence de perception de la douleur peut être associée à de nombreux facteurs physiologiques, psychologiques, socioculturels, et peut impliquer de nombreux systèmes physiologiques qui sont tous fonctionnellement interconnectés. Les différents projets effectués tant chez l'humain que chez l'animal ont permis d'étudier le rôle du sexe, des hormones gonadiques et de leurs métabolites endogènes dans la réponse nociceptive et la perception de la douleur.

1. Différence de perception de la douleur entre les hommes et les femmes

1.1 Retour sur les différences de perception de la douleur chez les hommes et les femmes: projet 12-109

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont permis de décrire, dans un premier temps, la différence de perception de la douleur chez les hommes et les femmes. Nous avons décrit la réponse à la douleur lors d'une rampe de température rapide et d'une rampe lente. Les groupes de participants étaient composés d'hommes et de femmes âgés entre 18 et 35 ans. Les résultats obtenus ont démontré une différence de perception de la douleur incontestable entre les hommes et les femmes. De plus, ces résultats ont permis de mettre en évidence plusieurs facteurs impliqués dans la modulation de la douleur tels que l'anxiété, la « catastrophisation », le tempérament d'évitement du danger, le genre et la variabilité cardiaque. Il a été étonnant de constater que la description de la douleur perçue, évaluée par le *McGill Pain Questionnaire*, était similaire entre les hommes et les femmes malgré la différence de la réponse nociceptive. Ce projet a permis de conclure que le facteur

« sexe » est majoritairement responsable de la différence de perception de la douleur entre les hommes et les femmes (par rapport au genre, à l'anxiété ou à la « catastrophisation » par exemple).

1.2 Comparaison des différences de perception de la douleur chez l'humain et chez l'animal

Les protocoles de douleur utilisés chez l'humain avaient été définis, en partie, afin de pouvoir comparer les résultats humains aux résultats obtenus chez l'animal lors du test de la plaque chaude dynamique. Ce test avait donné d'étonnants résultats chez les mâles et chez les femelles souris. En effet, plutôt que d'observer les différences typiques d'hyperalgésie chez les femelles, des seuils de douleur et une tolérance plus grande que ceux des mâles ont été mesurés.

Plusieurs paramètres peuvent avoir influencé ce résultat, que ce soit la microcirculation de la peau, la transmission nociceptive des fibres A δ et C, l'intégration de l'information nociceptive, la réactivité de l'axe HHS. Cependant, considérant les résultats chez l'humain, il semblerait que certains de ces éléments aient des rôles relativement minimes sur le résultat final (influence au mieux 9-10% de la variabilité, section 4.4 du chapitre traditionnel), du moins chez l'humain. Cette information réoriente les liens causaux des observations faites chez l'animal. Conséquemment, l'intégration de l'information nociceptive semble être une composante importante du résultat observé entre les sexes chez l'animal. En effet, ce facteur est ardu à mesurer chez l'animal et est particulièrement difficile à comparer à l'humain.

L'évaluation de la réponse nociceptive chez l'animal est faite par l'interprétation de différents comportements qui sont généralement associés à la douleur. La souris répond à la stimulation de la plaque chaude dynamique par le saut. Il s'agit d'une réponse très particulière puisque, chez cet animal, les comportements de

retrait de la patte ou de léchage sont généralement précurseurs du saut, ce qui n'est pas le cas dans ce modèle expérimental (Wilson et Mogil, 2001; Mogil et Crager, 2004). Plusieurs collègues ont remis en cause la notion de réponse « nociceptive » lors de ce test. Il est à noter qu'aucune équipe avant celle du Pr Poisbeau n'avait effectué de rampe de température aussi lente. Lorsque Yalcin et ses collaborateurs ont fait la description de cette plaque chaude dynamique, ils ont défini que le saut était le comportement le plus représentatif de la réponse nociceptive chez la souris (Yalcin *et al.*, 2009a). Les autres utilisateurs de la plaque chaude dynamique utilisaient une rampe qui était aussi lente. Cependant, elle débutait à une température de 42°C (au lieu de 30°C) et mesurait uniquement le seuil de douleur évalué par le comportement de léchage (Tjolsen *et al.*, 1991).

1.3 Neurobiologie de la perception d'une situation potentiellement dangereuse chez l'animal

Une différence majeure entre l'intégration de l'information nociceptive lors du test de la plaque chaude dynamique chez l'animal et son équivalent chez l'humain est l'aspect défini qu'a la stimulation dans le temps. L'humain connaît le déroulement de la stimulation ; il est conscient et volontaire. Il sait que la stimulation cessera à un moment. Chez l'animal, cette situation est considérée comme inévitable (« *inescapable* ») puisqu'elle ne s'arrête pas après le seuil de douleur et perdure sur une plus longue période. D'ailleurs, une rampe lente de chaleur a été démontrée comme étant de type inévitable chez le rat (Lumb *et al.*, 2002). L'animal ne peut pas éviter la douleur et doit s'y contraindre, cela crée une perception du danger bien différente chez l'animal en comparaison de celle chez l'humain. Il est d'ailleurs connu que la gestion du danger peut se faire différemment en fonction de la définition de la stimulation (Keay *et al.*, 2001). De plus, dépendamment de la perception de la situation dangereuse (inévitabile ou *évitable*), celle-ci sera gérée par des régions distinctes du cerveau.

Il est décrit qu'en fonction de la modalité de la stimulation nociceptive, ou du stress, la gestion émotionnelle de la situation sera différente. Keay décrit qu'une stimulation nociceptive mécanique produira une réponse rapide de retrait et de protection du membre stimulé (Keay et Bandler, 2001; Keay *et al.*, 2001). Cette réaction est décrite comme étant émotionnelle et active (évitable). Ce type de stimulus, qui est court dans le temps, peu importe son intensité, produira un effet spontané, souvent associé à une augmentation de la réponse cardiovasculaire, une augmentation de la vigilance et de la réactivité. Il a pour objectif de préparer à la confrontation, à la fuite, ou à l'évitement de la situation. Si l'on transpose chez l'humain, une situation dite évitable serait une situation qui est stressante, mais contrôlable.

À l'opposé, une stimulation plus longue, souvent associée chez l'animal à des modèles de douleur profonde et tonique, produira une réaction passive (inévitable) (Keay *et al.*, 2001; Lumb, 2002). Ce type de réponse est associé plutôt à un état de quiescence et de repliement sur soi-même. L'animal met en place un état de survie à long terme, incluant une diminution du rythme cardiaque et de la pression artérielle, une diminution de la vigilance et de la réactivité. L'objectif de ce mécanisme est de permettre la guérison et le rétablissement. Chez l'humain, ce type de situation pourrait être associé à un stress psychologique répété, vécu comme étant incontrôlable. De plus, il a été décrit que l'intégration de ses stratégies de gestion des situations douloureuses est produite par des régions cérébrales distinctes. En effet, la gestion active d'une stimulation nociceptive est faite par la SGPA latérale et dorsolatérale, tandis que la gestion passive est intégrée par la SPGA ventrolatérale (Keay *et al.*, 2001).

La différence primordiale entre l'intégration de stimuli nociceptifs chez l'animal et chez l'humain est l'implication du cortex préfrontal (CPF) dans la gestion émotionnelle active. Il a été observé chez le macaque et chez le rat que certaines projections entre le CPF et la SGPA sont présentes (An *et al.*, 1998; Floyd *et al.*,

2000). Ces projections relient le CPF et la région dorsolatérale de la SGPA, qui est chargée de la gestion active des situations dangereuses. Étonnamment, cette région ne reçoit aucune afférence de la moelle épinière ni du NTS. Ainsi, cela laisse supposer que la gestion active de la douleur pourrait être induite sans contact physique et pourrait être activée, par exemple, par un stress psychologique (Keay et Bandler, 2001).

Aucune étude n'a précisément investigué ce phénomène chez des mâles et des femelles. Cependant, des études qui s'en rapprochent ont été faites à l'aide de chocs électriques inévitables chez des rats mâles et femelles. Cette étude rapportait que les mâles réagissaient plus fortement à ce type de stress. Notamment, ils prenaient plus de temps avant de retourner dans la boîte où ils avaient reçu les chocs. Les auteurs décrivent leur réaction comme étant de l'évitement passif, alors que les femelles présenteraient moins d'inhibition active (Steenbergen *et al.*, 1990).

En résumé, il est possible de suggérer que la différence de réponse nociceptive entre les animaux et les humains soit principalement associée à la perception de la douleur et à sa rationalisation.

1.4 Réponse nociceptive des mâles et des femelles lors du test de la plaque chaude dynamique

La réponse nociceptive observée chez les mâles et les femelles lors du test de la plaque chaude dynamique nous a surpris à première abord. En effet, bien que certains groupes, utilisant des tests comportementaux spécifiques, ont observé des réponses nociceptives supérieures chez les mâles, l'inverse est le plus souvent observé (Aloisi *et al.*, 1995; Tall et Crisp, 2004; Mogil, 2012). Deux explications sont possibles afin de soutenir cette réponse précoce des mâles lors de la plaque chaude dynamique. Premièrement, il est possible de suggérer que la stratégie de gestion de la douleur chez le mâle et la femelle soit différente. En effet, le mâle présenterait une

stratégie active face à la douleur alors que la femelle présenterait une stratégie passive face à la douleur. Selon cette hypothèse, la réaction précoce des mâles ne serait pas associée à la transmission nociceptive, mais bien à l'intégration et la réaction à un stimulus potentiellement nocif. Le deuxième scénario impliquerait une intégration similaire chez le mâle et la femelle, mais supposant une dynamique différente. D'ailleurs, Keay et ses collaborateurs mentionnaient que ces stratégies de gestion de la douleur, chez le rat, étaient souvent combinées et que la gestion passive suivait souvent la gestion active de la douleur (Keay et Bandler, 2001; Keay *et al.*, 2001). Considérant cet élément de séquence, il serait possible de suggérer que les mâles présentent une réaction active très tôt et de façon assez forte, qui est ensuite suivie pas une étape de gestion passive. Pour leur part, les femelles présenteraient une gestion active de la douleur qui arriverait lentement et graduellement, ce qui expliquerait le comportement tardif par rapport à celui des mâles. Cette dernière hypothèse permettrait d'expliquer certaines observations faites chez les souris mâles. En effet, chez plusieurs mâles, nous avons observé que la première réponse comportementale arrivait tôt en début d'expérimentation. Cependant, il arrivait parfois que ces animaux n'atteignent pas le nombre limite de sauts. Plutôt que d'augmenter leur réponse nociceptive de façon linéaire, ceux-ci entraient en phase passive et arrêtaient tous comportements nociceptifs (ils se mettaient dans un coin de la plaque chaude et arrêtaient de bouger). Une autre hypothèse pour cette diminution des comportements nociceptifs serait l'activation des mécanismes de contrôle inhibiteurs de la douleur chez ces mâles.

Un marquage de la protéine c-fos dans la moelle épinière et la SGPA aurait permis de visualiser l'activité neuronale et nous aurait permis de mieux comprendre les mécanismes neurologiques impliqués dans les résultats comportementaux observés. De plus, ils auraient pu être comparés aux mécanismes impliqués dans un test de plaque chaude fixe, durant lequel la douleur est aiguë et momentanée, davantage similaire à une douleur de type évitable.

La réaction observée chez l'animal lors du test de la plaque chaude dynamique est très peu transposable à celle de l'humain. En effet, ce type de stimulation produit très peu de réactions émotionnelles et/ou physiologiques chez l'humain. Les résultats ont montré qu'il y avait une légère présence d'anxiété situationnelle pendant la stimulation nociceptive, mais très peu de catastrophisme (Figure 22, chapitre traditionnel). De plus, la libération de cortisol est minime et l'activation du système nerveux sympathique implique surtout la variabilité cardiaque (mesurée par les analyses spectrales) plutôt que la modulation directe de la fréquence cardiaque ou de la pression artérielle chez ces sujets (Figure 24 et 25, chapitre traditionnel).

Au final, la transposition de l'expérimentation animale chez l'humain a plutôt permis de mettre de l'avant l'implication de différents facteurs psychologiques et physiologiques dans les différences de perception de la douleur entre les hommes et les femmes. Cependant, nos expérimentations ont été faites chez des sujets sains; sachant que les sujets atteints de douleurs chroniques ont une perception et une gestion de la douleur différente (McDermid *et al.*, 1996; Hassett *et al.*, 2000; Burgmer *et al.*, 2011), il serait intéressant de mesurer l'implication de ces facteurs chez ces sujets.

2. Implication des hormones gonadiques et adrénérergiques dans la modulation de la douleur

Lors de l'étude des hormones sexuelles chez les sujets sains et chez les sujets atteints de fibromyalgie, nous avons pu conclure que les hormones sexuelles sont impliquées dans la modulation de la perception de la douleur. Toutefois, leurs actions concrètes sont minimes et leurs implications se situent plutôt au niveau de la modulation fine de la perception de la douleur. Une différence dans les niveaux de cortisol a été observée entre les sujets fibromyalgiques et les sujets sains, cependant aucune différence au niveau des androgènes (DHEA, DHEAS et testostérone), ni des ratios hormonaux (DHEAS/DHEA et cortisol/DHEA) n'a été mesurée.

2.1 Rôle des hormones stéroïdiennes dans la perception de la douleur chez les sujets sains

Chez les sujets sains, nous avons pu observer des corrélations positives et statistiquement significatives entre la DHEA et la température du seuil de tolérance à la douleur. Ces corrélations signifient que plus les niveaux de DHEA sont élevés, plus la personne est tolérante à la douleur. Donc, la DHEA est aussi négativement corrélée (mais ce résultat n'est pas statistiquement significatif) avec la douleur rapportée pendant le bain d'eau froide. Encore une fois, plus la DHEA plasmatique est élevée, plus la douleur perçue dans le bain d'eau froide est faible. Dans le même ordre d'idée, chez ces mêmes sujets, nous avons observé des corrélations positives et significatives entre le ratio DHEAS/DHEA et le seuil de tolérance à la douleur. Ces deux résultats démontrent les propriétés antinociceptives de ce stéroïde.

Ces deux androgènes (DHEA et DHEAS) sont de plus en plus étudiés dans la littérature pour leurs effets antinociceptifs, d'une part, et leur diminution dans plusieurs pathologies de douleur chronique, d'autre part (Dessein *et al.*, 1999; Freitas *et al.*, 2012). Étonnamment, aucune corrélation entre les niveaux de progestérone, d'estradiol ou de testostérone n'a été observée dans notre étude. Ces résultats sont partiellement en accord avec des résultats non publiés que Yannick Tousignant-Laflamme avait obtenus au cours de son doctorat dans le laboratoire du Pr Serge Marchand. En effet, il n'avait pas observé de corrélation entre les seuils de douleur, la perception de la douleur ou la tolérance et les hormones sexuelles. Cependant, il avait observé une corrélation positive entre la progestérone et le CIDN, uniquement lors de la phase ovulatoire des femmes saines (Tousignant-Laflamme et Marchand, 2009). Certains résultats non publiés, obtenus au laboratoire, ont montré une implication importante de la testostérone particulièrement chez des hommes hypogonadiques, chez des femmes souffrant du syndrome des ovaires polykystiques (SOPK, chez qui les niveaux de testostérone sont anormalement élevés) ou chez les transsexuels en

processus de changement de sexe (Pagé, 2010). Ainsi, les résultats présentés démontrent que la modulation fine de ces hormones n'est pas suffisante pour modifier significativement la réponse à des stimulations douloureuses. Cependant, des modifications plus importantes, telles que celles observées chez les sujets hypogonadiques, SOPK ou transsexuels, pourraient par contre avoir des effets plus concrets sur la douleur.

2.2 Rôle des hormones stéroïdiennes dans la perception de la douleur chez les sujets atteints de fibromyalgie

Tel que discuté dans l'article #1, la DHEAS semble être associées à la sévérité de certains symptômes chez les sujets fibromyalgiques (FM). En effet, des corrélations positives ont été observées entre la concentration plasmatique de DHEAS, la faible qualité du sommeil et le seuil de douleur mécanique perçue aux différents points de pression.

Ce qui est paradoxal dans ces observations, c'est la direction opposée des effets de la DHEA(S) (DHEA et DHEAS) entre les sujets sains et les sujets FM. Chez les sujets sains, la présence de DHEA(S) diminue la perception de la douleur, alors que chez les sujets FM, les fortes concentrations de DHEA(S) corrèlent avec l'augmentation des symptômes de la pathologie. Des effets biphasiques de la DHEA ont été observés chez l'animal (Kibaly *et al.*, 2008). En effet, lors de son étude, Kibaly et ses collaborateurs ont observé une réponse pronociceptive précoce puis une réponse antinociceptive tardive.

Il est évident que des mesures supplémentaires utilisant des groupes rassemblant un plus grand nombre de sujets seront nécessaires afin de confirmer ces résultats. Il serait aussi intéressant de mesurer ces niveaux hormonaux dans d'autres pathologies de douleur chronique pour voir si le même effet biphasique se produit.

2.3 Le rôle de l'allostase dans les pathologies de douleur chronique

La fibromyalgie est au coeur de plusieurs recherches. Il s'agit d'une pathologie complexe dont les scientifiques ont toujours de la difficulté à cerner l'origine. La différence de prévalence de la pathologie entre les hommes et les femmes sous-tend une implication du sexe et/ou des hormones gonadiques. Comme décrit par les différents projets, les interrelations entre le sexe, le stress, les hormones gonadiques, et l'axe HHS dans l'apparition des symptômes doit pouvoir être pris en considération. La notion d'allostase est un concept qui est de plus en plus mis de l'avant dans cette pathologie puisqu'il tient compte d'une multitude de facteurs pouvant influencer l'apparition de douleur et particulièrement le maintien de celle-ci.

Comme mentionné dans l'introduction (Sections 1.5, 1.6 et 1.7), la fibromyalgie est une pathologie présente chez des personnes anxieuses, catastrophisantes, perfectionnistes, dont les niveaux de stress sont particulièrement élevés. L'observation de niveaux de cortisol plasmatique (Article #2) supérieurs à la normale chez ces sujets n'est pas étonnante considérant ces éléments.

Le paradoxe avec cet état de stress est simple dans les faits, mais complexe dans sa physiologie. Un stress aigu est bon pour l'organisme ; il permet de surmonter une situation dangereuse, de combattre, de fuir. Cependant, le maintien de ce stress dans le temps entraîne la résistance et l'épuisement. Donc, sa nature adaptative de base peut se transformer en absence de résilience et se traduire en conséquence dramatique sur la plasticité neuronale (Korte *et al.*, 2005).

L'adaptation à un stress se produit par l'allostase. Ce concept se définit comme le processus actif permettant le maintien de la stabilité du corps, impliquant des hormones adrénérergiques, des neurotransmetteurs, des cytokines et le système nerveux autonome. La surcharge allostatique survient lorsque ces médiateurs ne retournent pas à leur état basal. Ces médiateurs de l'allostase décrivent très bien les dysfonctions présentes chez les sujets fibromyalgies. En effet, des perturbations de

l'axe HHS, autonomiques, auto-immunes, une altération de certains neurotransmetteurs entraînant souvent de la dépression et d'autres pathologies comorbides sont souvent observées. Les causes d'une surcharge allostatique sont relativement intuitives : un stress répété, une incapacité à s'adapter à un stress répété, une absence de résilience des systèmes impliqués dans l'allostasie du stress, une incapacité à produire une réponse adéquate à un stress (McEwen et Wingfield, 2003; Korte *et al.*, 2005). Une hypothèse soutient aussi que certaines personnes seraient génétiquement prédisposées à la surcharge allostatique (Korte *et al.*, 2005).

Plusieurs recherches devront être faites afin de comprendre quels types de personnes sont à risque de ces surcharges allostatiques et une fois la surcharge mise en place, comment la désactiver. Dans la situation de la fibromyalgie, est-ce que la surcharge allostatique est le point central de cette pathologie ou en est-elle un symptôme? De plus, la relation directe entre la surcharge allostatique et la douleur est primordiale pour les futures recherches.

3. Implication des métabolites $3\alpha 5\alpha$ -réduits dans la modulation de la douleur

Les articles #2, 3 et 4 ont tenté de mettre en évidence, dans un premier temps, le rôle des hormones gonadiques et de leurs métabolites dans les mécanismes de transmission et de modulation de la douleur. L'exploration de ces hormones stéroïdiennes chez l'animal comporte certains avantages et certains inconvénients par rapport à l'étude chez l'humain. En effet, l'expérimentation chez l'animal ne comporte par toute la composante affective de la douleur qui est présente chez l'humain. Cependant, la composante motivationnelle, de même que la perception d'une douleur en tant qu'émotion homéostatique, est gérée différemment chez l'humain et l'animal. Ceci est possiblement dû à la rationalisation de la stimulation nociceptive (Keay et Bandler, 2001; Craig, 2003). Une autre différence importante est la réponse nociceptive en tant que telle. L'humain vulgarise sa douleur, il peut en définir l'intensité, l'aspect désagréable; il peut lui attribuer des qualificatifs ou verbaliser les

émotions associées à cette douleur. L'animal, de son côté, réagit par différents comportements qui sont interprétés par l'expérimentateur. Plusieurs facteurs peuvent influencer ces comportements : le bruit, les odeurs, l'environnement (Wilson et Mogil, 2001). Les animaux doivent être acclimatés et la rigueur expérimentale doit être sans faille pour que la reproductibilité soit bonne et diminuer la variabilité des résultats. Bien que, comme chez l'humain, une partie de la méthodologie soit contrôlable afin d'éviter certains facteurs pouvant biaiser l'expérimentation, l'interprétation du comportement animal est moins précise que l'évaluation de la douleur chez l'humain.

3.1 La variabilité des différences de réponses nociceptives chez les mâles et les femelles

Bien que la différence de perception de la douleur entre les hommes et les femmes était particulièrement claire lors des expérimentations chez l'humain, la différence de réponse nociceptive chez l'animal a été très variable. Cette variabilité a été largement décrite dans la littérature (Leo *et al.*, 2008; Mogil, 2012). Au laboratoire du Pr Poisbeau, la réponse nociceptive chez des mâles et des femelles a été évaluée chez des souris et des rats, en utilisant plusieurs modèles de douleur (test à la formaline, test du filament de Von Frey, plaque chaude fixe, plaque chaude dynamique, pince calibrée). Plusieurs modèles n'ont pas permis d'observer de différences entre les mâles et les femelles (test à la formaline, test de von Frey). Cependant, comme il a été décrit plus haut, les différences de réponses nociceptives entre les souris mâles et les femelles à la plaque chaude dynamique sont particulièrement marquées. Ces résultats, bien qu'ils aient été reproduits à plusieurs reprises, n'ont toujours pas d'explication précise.

Chez le rat, la pince calibrée a permis d'observer des différences de réponse à la douleur entre les mâles et les femelles. La réponse nociceptive produite par la pince calibrée était d'ailleurs modifiée par la présence ou l'absence des gonades. Des

différences d'analgésie induites par le stress ont aussi été observées chez le rat en utilisant la pince calibrée comme mesure nociceptive (Article #3).

3.2 Le paradigme de nage forcée

Afin d'étudier le rôle des métabolites endogènes des hormones stéroïdiennes, nous avons utilisé un protocole de nage forcée décrit par le Pr Robert Purdy au début des années 90. Il avait montré qu'une nage forcée de 10 minutes à 22°C produisait la libération de métabolites 3 α 5 α -réduits dans le cerveau et dans le plasma selon une dynamique particulière (Purdy *et al.*, 1991). Nous avons choisi ce type de stimulation puisque la libération endogène de neurostéroïdes peut se produire suite à différents stimuli (douloureux ou non douloureux). La synthèse endogène de neurostéroïdes avait déjà été démontrée dans des modèles de douleur associée à la carragénine (Poisbeau *et al.*, 2005). Cependant, considérant que ce modèle de douleur produit des différences entre les mâles et les femelles qui sont à l'opposé des résultats typiques (les mâles ont plus de douleur que les femelles), et que l'un des objectifs était d'évaluer le rôle des neurostéroïdes dans les mécanismes de modulation de la douleur, nous avons opté pour le paradigme de nage forcée présenté par Purdy (Purdy *et al.*, 1991).

Ce paradigme de nage forcée n'avait jamais été utilisé pour produire de l'analgésie induite par le stress. Ce type d'analgésie peut être associé à la libération de peptides opioïdes, pourrait impliquer les récepteurs NMDA ou résulter d'effets mixtes (Butler et Finn, 2009). Nous avons d'abord fait la caractérisation de ce modèle, et tel que décrit dans l'article #3, nous avons pu définir qu'une nage forcée de 10 minutes à 22°C était de type non opioïdérique.

L'influence de l'antagoniste du récepteur NMDA, MK-801, sur l'analgésie induite par le stress chez le mâle et la femelle était relativement similaire. Cependant, un nombre de sujets plus élevé aurait sans doute permis de voir une différence entre

les mâles et les femelles, telle que décrit par Mogil au début des années 90 (Mogil *et al.*, 1993). En effet, la réduction était statistiquement significative chez le mâle. Cependant, chez la femelle, la diminution de la réponse nociceptive frôlait la significativité statistique. Ces résultats n'ont pas été discutés spécifiquement dans l'article puisque les résultats n'étaient pas suffisamment puissants pour montrer une différence claire. Deuxièmement, puisque ces observations avaient été démontrées par Mogil dans le passé, nous avons peu d'intérêt à reproduire ces résultats. De plus, l'objectif de cette caractérisation chez le mâle et la femelle était uniquement de décrire le mécanisme sous-jacent à notre paradigme de nage forcée.

Une de nos hypothèses était que la synthèse de stéroïdes endogènes produits par le stress serait différente chez le mâle en comparaison de la femelle. Nous avons tenté de doser ces stéroïdes par technique de HPLC en collaboration avec le Pr Yannick Goumon à l'Université de Strasbourg (ces données ne sont pas présentées dans ce document). Cependant, la plupart des métabolites $3\alpha,5\alpha$ -réduits ne pouvaient être dosés avec une sensibilité suffisante pour être détectés convenablement.

3.3 Rôles des métabolites $3\alpha,5\alpha$ -réduits dans la réponse nociceptive chez les mâles et les femelles

Un des objectifs de ce projet était, entre autres, d'évaluer l'implication des métabolites endogènes des hormones stéroïdiennes dans les mécanismes de transmission et d'inhibition de la douleur. Nous avons inhibé la synthèse des stéroïdes endogènes en utilisant, chez le rat, le finastéride, un inhibiteur de l'enzyme 5α -réductase, et chez la souris, la depo-provéra (MPA : medroxyprogestérone acétate), un inhibiteur de l'enzyme 3α -hydroxystéroïde déshydrogénase.

Ces projets ont permis de déterminer que les métabolites endogènes des stéroïdes ne semblent pas être impliqués, en situation hormonale stable, dans les mécanismes actifs d'inhibition de la douleur. Ces résultats ont été observés lors du

paradigme de nage forcée chez le rat, et lors de l'analyse de l'interphase du test à la formaline chez la souris. La littérature avait décrit que des neurones GABAergiques du tronc cérébral pourraient être impliqués dans la modulation de la douleur. Tel que mentionné dans l'introduction, l'injection d'agonistes et d'antagonistes du récepteur GABA_A dans la SGPA, la MRV et l'amygdale centrale, entraîne une modulation de la douleur au test du retrait de la queue, de plaque chaude fixe et du test à la formaline (Moreau et Fields, 1986; Gilbert et Franklin, 2001; Hasanein *et al.*, 2008; Heinricher *et al.*, 2009). C'est dans cette perspective que l'hypothèse d'une modulation des MCDD par les métabolites 3 α 5 α -réduits a été suggérée.

Étonnamment, bien que nous n'ayons observé aucun effet de la déplétion des métabolites endogènes des hormones stéroïdiennes sur les mécanismes inhibiteurs descendants de la douleur, nous avons tout de même observé une modulation de la douleur aiguë par l'injection d'inhibiteur des enzymes de synthèse des neurostéroïdes. En effet, l'injection de finastéride chez le rat, comme l'injection de provérol chez la souris, a augmenté la réponse nociceptive au test de la pince calibrée chez le rat mâle (article #3), lors de la phase aiguë du test à la formaline chez la souris mâles (article #2), de même que la réponse nociceptive produite par la plaque chaude dynamique toujours chez la souris (article #2). Ces effets ont été observés uniquement chez les animaux mâles, et de façon plus marquée chez les animaux castrés. Ces résultats concordent aussi avec les injections de neurostéroïdes intrathécales chez le rat lors du test à la formaline (ces données ne sont pas présentées dans ce document). Ces résultats soulèvent plusieurs questionnements puisque le rôle des neurostéroïdes dans la modulation de la douleur (du moins dans les mécanismes spinaux) est assez bien décrit dans la littérature. Cependant, les expérimentations soutenant cette littérature sont effectuées majoritairement chez des animaux mâles et très peu chez les femelles.

Afin de déterminer la cause de cette différence de réaction aux inhibiteurs de neurostéroïdogenèse entre les mâles et les femelles, nous avons quantifié l'expression génique de plusieurs récepteurs auxquels se lient les neurostéroïdes (voir l'annexe 1

pour les résultats complémentaires), entre autres, les sous-unités des récepteurs GABA_A (Article #3, $\alpha 1$, $\alpha 4$, δ , γ), les cotransporteurs des ions chlorures (NKCC1 et KCC2), les différents récepteurs des opioïdes (δ , μ , κ) et certaines sous-unités des récepteurs NMDA (NR2A et NR2B). Plusieurs différences entre les mâles, les femelles, sham-gonadectomisés ou gonadectomisés ont été observées. Cependant, aucun des résultats ne peut expliquer spécifiquement la réaction importante des animaux castrés aux inhibiteurs de stéroïdogenèse, ni la plus grande sensibilité à certains neurostéroïdes injectés directement dans la moelle épinière. Un élément intéressant de ce résultat est l'observation de la complexité des variations des différents récepteurs. En effet, les résultats montrent que pour certains récepteurs, les mâles ont des niveaux d'expression génique plus élevés que les femelles. Pour d'autres récepteurs, c'est l'inverse qui se produit. Finalement, certaines situations montrent une augmentation d'expression similaire chez les animaux gonadectomisés mâles et femelles, alors que pour d'autres récepteurs, les animaux gonadectomisés mâles et femelles vont dans des directions différentes. Il est possible de suggérer que dans certaines situations, l'effet serait créé par la modulation d'un unique récepteur, mais il est davantage probable que les réponses nociceptives observées soient associées à la résultante de ces multiples modifications géniques. De plus, il ne faut pas négliger l'implication d'autres facteurs afin d'expliquer ces résultats. Par exemple, la testostérone pourrait aussi moduler l'activité enzymatique impliqué dans la synthèse d'hormones ou de neurotransmetteurs. Une étude de l'activité enzymatique de certaines hormones clés (par exemple l'aromatase, transformant la testostérone en estradiol) ou de certains neurotransmetteurs (par exemple les enzymes de synthèse du GABA, la GAD) aurait pu être faite.

3.4 Implication des variations hormonales associées au cycle menstruel dans la transmission et la modulation de la douleur

La chute de progestérone associée à la fin de la phase lutéale, et à la transition vers la phase menstruelle, est un moment critique du cycle ovarien. Elle est pointée

du doigt comme cause des fluctuations de l'humeur dans le syndrome de dysphorie prémenstruel, mais aussi dans le domaine de la douleur. Cette variation soudaine, en plus de provoquer des migraines et différentes douleurs chez les personnes saines, cause aussi une recrudescence des symptômes douloureux dans plusieurs pathologies de douleur chronique (Anderberg *et al.*, 1998; Houghton *et al.*, 2002; LeResche *et al.*, 2003; Powell-Boone *et al.*, 2005).

Au laboratoire, Yannick Tousignant-Laflamme a observé une variation des CIDN pendant le cycle menstruel chez des sujets sains (Tousignant-Laflamme et Marchand, 2009). En effet, dans son projet de doctorat, les seuils de douleur n'ont pas été modifiés lors de la phase lutéale. Par contre, un CIDN « comparable à celui des hommes » était observé uniquement pendant la phase ovulatoire, donc l'amplitude des CIDN étaient diminuée lors de la phase lutéale et menstruelle (Tousignant-Laflamme et Marchand, 2009). Malgré ces observations, aucune corrélation claire n'a pu être établie entre les concentrations hormonales et le CIDN pendant la phase lutéale. Considérant ces résultats, nous nous sommes donc questionnés afin de savoir comment la chute de progestérone pouvait influencer la transmission et la modulation de la douleur, mais particulièrement: quel est le rôle des métabolites endogènes des hormones stéroïdiennes dans ce phénomène physiologique?

Le protocole de retrait de progestérone utilisé afin de mimer la transition de la phase lutéale vers la phase menstruelle du cycle ovarien a été décrit, et très bien caractérisé, par le groupe de Thelma Lovick à l'Université de Birmingham (Voir Introduction section 2.1). Les animaux étaient injectés avec de la progestérone deux fois par jour (à 7h00 et 17h00) pendant 6 jours consécutifs. Le 7^e jour, l'animal recevait une injection de véhicule uniquement. Les animaux étaient testés le 8^e jour. De plus, les animaux recevaient une injection de finastéride ou du véhicule, un jour sur deux, pendant 7 jours. Ce protocole nous a permis de montrer que l'analgésie induite par le stress était inhibée par la chute de progestérone induite pharmacologiquement. Un élément particulièrement intéressant est que l'inhibition de

la neurostéroïdogénèse par le finastéride a permis de ramener l'analgésie induite par le stress à son niveau de base.

Dans cette situation, la présence des neurostéroïdes aurait un effet antianalgésique, ce qui est en accord avec les résultats démontrés par Gilbert et ses collaborateurs (2001). Ceux-ci observaient que l'injection d'un agoniste du récepteur GABA_A dans la MRV avait un effet pronociceptif lors du test de retrait de la queue. À l'opposé, l'injection de bicuculline (un antagoniste du récepteur GABA_A) dans la MRV avait un effet antinociceptif lors du test du retrait de la queue et du test à la formaline (Gilbert et Franklin, 2001).

Lovick et ses collaborateurs proposent une hypothèse très convaincante permettant d'expliquer, dans leur cas, l'augmentation de l'hyperalgésie suivant une situation anxigène. Cette équipe suggérait que la chute de progestérone induisait une augmentation de l'expression des récepteurs GABA_A contenant des sous-unités δ (Lovick et Devall, 2009). Cette augmentation de l'expression de ces récepteurs augmentait l'inhibition des cellules OFF et empêchait l'inhibition de la transmission nociceptive dans la moelle épinière. Cette même équipe a observé, par technique d'immunohistochimie sur coupe, l'augmentation de l'expression des récepteurs GABA_A contenant des sous-unités $\alpha 4$, $\beta 1$ et δ (Lovick et Devall, 2009). Dans notre expérimentation, nous avons plutôt choisi de mesurer, par technique de PCR quantitatif, l'expression génique de ces sous-unités dans la moelle épinière et le tronc cérébral. Nous avons observé une augmentation de récepteurs GABA_A γ dans la moelle épinière et une diminution des récepteurs GABA_A δ dans le tronc cérébral. De plus, nous avons mesuré une augmentation du ratio NKCC1/KCC2 dans le tronc cérébral. Les rôles des cotransporteurs NKCC1 et KCC2 sont schématisés à la Figure 27. L'augmentation de ce ratio signifie globalement, une plus grande expression des cotransporteurs permettant l'entrée des ions chlorures dans les cellules par rapport aux cotransporteurs permettant leur sortie.

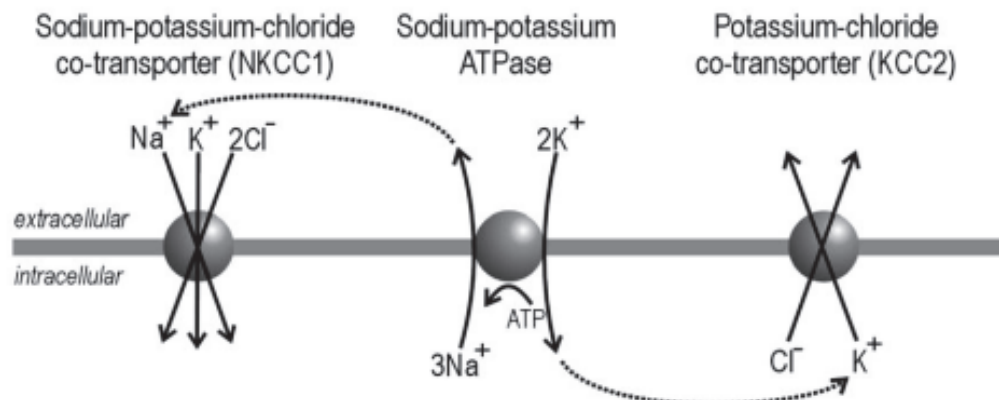


Figure 27. Transport des ions chlorures par les cotransporteurs NKCC1 et KCC2 dans les mécanismes de douleur

Ce schéma représente les cotransporteurs des ions chlorure à travers la membrane plasmatique des cellules. Le cotransporteur NKCC1 permet l'entrée d'ions chlorures dans la cellule, alors que le cotransporteur KCC2 permet la sortie des ions chlorures. Le processus de ces deux transporteurs est électroneutre, c'est à dire qu'il n'y a pas de transfert de charge net. De plus, ces co-transporteurs n'hydrolyse pas l'ATP eux-même, mais dépendent de gradients de concentration générés activement par une pompe sodium-potassium ATPase (ligne pointillée). Cette image ne rapporte pas tous les transferts ioniques neuronaux, mais représente ceux majoritairement impliqués dans les mécanismes de transmission et de modulation de la douleur, de même que ceux modulés en situation de douleur neuropathique. Image tirée de (Price *et al.*, 2009). Droits de reproduction obtenus #: 11080145).

Ces résultats suggèrent une modification de l'homéostasie des ions chlorures au niveau du tronc cérébral, mais aussi de la moelle épinière. Ce changement est dirigé globalement vers une augmentation des entrées des ions chlorures dans les neurones, ce qui entraîne normalement l'hyperpolarisation (l'inhibition) de ceux-ci et coïncide avec les résultats obtenus. Par contre, la diminution de l'expression génique des récepteurs GABA_A contenant des sous-unités δ est à l'opposé de la théorie présentée par Lovick et collaborateurs (2009). Cette divergence peut s'expliquer par la différence dans les techniques utilisées. En effet, eux mesuraient l'expression de protéines alors que nous avons quantifié l'expression génique. Nos résultats

pourraient signifier la traduction en protéine des ARNm impliqués dans la synthèse de protéine, résultant en une diminution des ARNm résiduels.

En comparaison avec des expérimentations lors desquelles les niveaux d'hormones étaient stables, nos résultats suggèrent que la chute hormonale fait varier de façon importante les concentrations de métabolites endogènes des hormones stéroïdiennes. Il est d'ailleurs connu que les concentrations de neurostéroïdes varient en fonction des concentrations de progestérone (Andréen *et al.*, 2006). Une seconde hypothèse est que la chute de progestérone modifie l'expression, en nombre ou en composition, des récepteurs GABA_A liant ces métabolites endogènes. Comme les résultats l'ont montré dans l'article #4, l'expression des sous-unités des récepteurs GABA_A a été modifiée par le retrait de progestérone. Cependant, cet effet ne peut expliquer complètement l'effet physiologique observé.

Ce que nos résultats apportent de nouveau est l'implication de multiples récepteurs et transporteurs dans le mécanisme sous-tendant la réaction physiologique observée. Il ne s'agit pas uniquement de l'expression des récepteurs GABA_Aδ, mais aussi des cotransporteurs qui ont un rôle important dans la gestion et l'importance des gradients ioniques impliqués dans l'hyperpolarisation neuronale. Ces résultats mettent en évidence le rôle, non seulement des hormones sexuelles et de leurs métabolites, mais aussi de l'expression des récepteurs responsables de l'homéostasie des ions chlorures dans les mécanismes, entre autres supraspinaux, de modulation de la douleur. Ces résultats apportent une nouvelle piste de recherche dans l'étude des dysfonctions des CIDN dans certaines pathologies de douleur chronique, particulièrement quand il y a une prévalence plus grande chez les femmes ou une exacerbation des symptômes douloureux durant la période prémenstruelle.

Malheureusement, les études observant la perception de la douleur lors du cycle menstruel dans ces pathologies sont bien souvent restrictives quant aux phases mesurées. Ces études observent majoritairement un cycle en 3 phases, c'est-à-dire la

phase folliculaire (ou menstruelle, généralement entre le jour 4 et le jour 7), la phase ovulatoire et la phase lutéale (entre le jour 18 et 22). Certaines équipes observent un cycle en 5 phases, incluant la phase menstruelle (1-3), la phase folliculaire (jour 6 à 9), la phase ovulatoire, la phase lutéale (18-22) et la phase prémenstruelle (jour 26 à 28). Le cycle en 3 phases permet de mesurer deux phases relativement stables et une phase dynamique, alors que le cycle en 5 phases est plus précis et permet d'observer 2 phases dynamiques.

Le rôle des neurostéroïdes chez l'humain, dans le domaine de la douleur, n'a pratiquement jamais été évalué (Mechlin *et al.*, 2007). Une des contraintes majeures est la difficulté d'obtenir des dosages de ces métabolites assez sensibles pour détecter les faibles concentrations présentes dans le sang. De plus, comme les résultats de l'article #1 l'ont démontré, il semblerait que le stress soit aussi un élément très important dans la mise en place des syndromes de douleur chronique, notamment dans la fibromyalgie. Il serait primordial d'établir, chez l'humain, le rôle des neurostéroïdes dans les mécanismes de transmission et de modulation de la douleur, chez les sujets sains et chez les sujets atteints de douleurs chroniques. De plus, l'implication de ces neurostéroïdes, et de leur variabilité dans le temps, devra être mise en relation chez ces différents groupes. Cela permettra d'établir l'ordre des modifications physiologiques et de déterminer le rôle à la fois des neurostéroïdes, de la douleur et du stress, dans le développement des pathologies de douleurs chroniques.

CONCLUSION

La différence de perception de la douleur entre les hommes et les femmes est la résultante de multiples facteurs interreliés dans un réseau complexe. Cependant, une grande ligne commune aux différents projets est l'importance particulière des causes biologiques dans les différences de perception de la douleur chez les hommes et les femmes.

La première partie du projet a évalué l'implication des facteurs psychologiques et les ont mis en relation avec la perception de la douleur chez les hommes et les femmes. Ce que ces résultats ont montré est que, même en considérant tous les paramètres psychologiques, la différence imposée par le sexe demeure le facteur le plus important relié à la différence de perception de la douleur entre les hommes et les femmes.

La seconde partie de cette thèse a étudié le rôle concret des stéroïdes chez les sujets sains et atteints de fibromyalgie. Nous avons entre autre pu observer une hypercortisolémie et une hyperactivité sympathique chez les sujets fibromyalgiques. Ces deux facteurs sont importants dans les mécanismes d'allostasie et cela est consistant avec l'hypothèse d'une surcharge allostatique chez ces sujets. Cette partie a mis en évidence l'importance des différents systèmes physiologiques impliqués dans certaines pathologies de douleur chronique. De plus, nous avons pu voir que les modulations fines des stéroïdes n'influencent pas la perception de la douleur de façon importante. Cependant, d'autres études réalisées au laboratoire, supportent que les différences plus importantes de stéroïdes (comme dans les modèles de gonadectomie chez l'animal) produisent des effets considérables sur la réponse nociceptive. Chez les sujets sains et les sujets fibromyalgiques, les modulations fines sembleraient particulièrement impliquées dans la dérégulation des différents systèmes. Ce sont ces multiples dérèglements qui semblent créer le syndrome dans sa finalité clinique.

Finalement, le rôle des métabolites endogènes des hormones stéroïdiennes a été évalué chez l'animal. Nous avons suggéré que ces neurostéroïdes affectent davantage les mécanismes de transmission de la douleur par rapport aux mécanismes de modulation de la douleur. Un résultat particulièrement intéressant est l'implication des neurostéroïdes lors de la phase prémenstruelle du cycle ovarien (chute de progestérone). En effet, lors de cette phase, les neurostéroïdes semblent influencer les mécanismes de contrôles inhibiteurs de la douleur. Ce résultat est particulièrement important puisqu'il pourrait expliquer la recrudescence des symptômes douloureux dans certaines pathologies de douleur. Ce phénomène serait d'ailleurs en partie associé à l'homéostasie des ions chlorures au niveau supraspinal. Ce système, impliquant les récepteurs GABA_A et plusieurs cotransporteurs, est souvent mis de côté malgré ses implications dans de nombreuses régions du cerveau chargées du fonctionnement des systèmes mis à contribution dans la régulation de l'allostase. La fibromyalgie est une pathologie complexe impliquant à la fois des facteurs psychologiques, des déséquilibres neurohormonaux, des altérations périphériques et centrales. Ce n'est qu'en ayant une meilleure compréhension de ces multiples facettes de cette pathologie qu'une thérapie adaptée pourra être mise sur pied.

Ce projet établit plusieurs liens dans une problématique que plusieurs tentent de simplifier à outrance. De nombreuses recherches seront nécessaires afin d'apporter des réponses aux multiples questionnements et hypothèses que ce projet de thèse a soulevés. Cependant, il est clair que les facteurs biologiques sont une cause importante dans la différence de perception de la douleur entre les hommes et les femmes. Les aspects biologiques ne se limitent pas qu'aux hormones sexuelles de base (progestérone, testostérone et estradiol), mais mettent aussi à contribution de nombreux systèmes physiologiques, notamment la réactivité du système nerveux autonome. Une perspective qui devra impérativement être développée est l'implication des neuropeptides (ocytocine, vasopressine, neuropeptide Y, cholécystokinine, peptide vasoactif intestinal, mélatonine, et autres) dans les différences de perception de la douleur entre les hommes et les femmes. Leurs

implications dans les mécanismes de perception de la douleur sont de plus en plus rapportées dans la littérature scientifique (Carr et Lipkowski, 1990). Ces neuropeptides sont impliqués dans de nombreux systèmes ce qui pourrait expliquer les nombreuses interrelations observées dans la perception de la douleur. Il a été décrit que certains neuropeptides, tels que l'ocytocine, sont modulés par les stéroïdes gonadiques et leur métabolites $3\alpha,5\alpha$ -réduits (Brussaard *et al.*, 2000).

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier mes directeurs de recherche le Pr Serge Marchand et le Pr Pierrick Poisbeau. De même que tous les membres de l'équipe de recherche sur la douleur et l'équipe de recherche "Déterminants moléculaires de la douleur", le département de physiologie de l'Université de Sherbrooke, le département Nociception et douleur de l'Université de Strasbourg. Finalement, un merci particulier au collectif Doctoneuro à Strasbourg pour les opportunités d'échange avec les étudiants en neuroscience de l'Université de Strasbourg.

Je remercie les organismes subventionnaires, le FRSQ et les IRSC, le collège doctoral européen et le QPRN qui m'ont permis de me déplacer entre les deux universités pendant cette cotutelle.

Merci à ma famille, Rémy, Tara et Lilith pour leur soutien moral tout au long de cette thèse. De même qu'à mes ami (es), particulièrement Marlène et Matei.

De plus, je remercie les membres de mon jury de thèse Pr Éric Rousseau, Pr Étienne Challet et Pr Pierre Beaulieu, pour leur temps et leur contribution à cet ouvrage.

Finalement, je suis très reconnaissante envers tous ceux qui sont venus assister à ma soutenance de thèse, qui m'ont soutenu et encouragé pendant cet évènement.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Adkins, C. E., Pillai, G. V., Kerby, J., Bonnert, T. P., Haldon, C., McKernan, R. M., *et al.* (2001). $\alpha 4\beta 3\delta$ GABA(A) receptors characterized by fluorescence resonance energy transfer-derived measurements of membrane potential. *J Biol Chem*, 276(42), 38934-38939.
- Akk, G., Covey, D. F., Evers, A. S., Steinbach, J. H., Zorumski, C. F., et Mennerick, S. (2007). Mechanisms of neurosteroid interactions with GABA(A) receptors. *Pharmacol Ther*, 116(1), 35-57.
- Akk, G., Shu, H. J., Wang, C., Steinbach, J. H., Zorumski, C. F., Covey, D. F., *et al.* (2005). Neurosteroid access to the GABAA receptor. *J Neurosci*, 25(50), 11605-11613.
- Aloisi, A. M., Albonetti, M. E., et Carli, G. (1995). Behavioural effects of different intensities of formalin pain in rats. *Physiol Behav*, 58 (3), 603-610
- Aloisi, A. M., Bachiocco, V., Costantino, A., Stefani, R., Ceccarelli, I., Bertaccini, A., *et al.* (2007). Cross-sex hormone administration changes pain in transsexual women and men. *Pain*, 132 Suppl 1(Suppl1), S60-67.
- Alonso, C., Loevinger, B. L., Muller, D., et Coe, C. L. (2004). Menstrual cycle influences on pain and emotion in women with fibromyalgia. *J Psychosom Res*, 57(5), 451-458.
- Alves, S. E., Lopez, V., McEwen, B. S., et Weiland, N. G. (1998a). Differential colocalization of estrogen receptor beta (ERbeta) with oxytocin and vasopressin in the paraventricular and supraoptic nuclei of the female rat brain: an immunocytochemical study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (6), 3281-3286.
- Alves, S. E., Weiland, N. G., Hayashi, S., et McEwen, B. S. (1998b). Immunocytochemical localization of nuclear estrogen receptors and progesterin receptors within the rat dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol*, 391(3), 322-334.
- Amandusson, A., et Blomqvist, A. (2001). [Estrogen receptors can regulate pain sensitivity. Possible explanation of certain chronic pain conditions]. *Lakartidningen*, 98(15), 1774-1778.
- Amandusson, A., Hallbeck, M., Hallbeck, A. L., Hermanson, O., et Blomqvist, A. (1999). Estrogen-induced alterations of spinal cord enkephalin gene expression. *Pain*, 83(2), 243-248.
- Amandusson, A., Hermanson, O., et Blomqvist, A. (1996). Colocalization of oestrogen receptor immunoreactivity and preproenkephalin mRNA expression to neurons in the superficial laminae of the spinal and medullary dorsal horn of rats. *Eur J Neurosci*, 8(11), 2440-2445.
- American Psychological Association. (2013). Personality, 2013, from <http://www.apa.org/topics/personality/index.aspx>
- Amital, D., Herskovitz, C., Fostick, L., Silberman, A., Doron, Y., Zohar, J., *et al.* (2010). The premenstrual syndrome and fibromyalgia--similarities and common features. *Clin Rev Allergy Immunol*, 38(2-3), 107-115.
- An, X., Bandler, R., Ongur, D., et Price, J. L. (1998). Prefrontal cortical projections to longitudinal columns in the midbrain periaqueductal gray in macaque monkeys. *J Comp Neurol*, 401(4), 455-479.

- Anderberg, U. M., Marteinsdottir, I., Hallman, J., et Backstrom, T. (1998). Variability in Cyclicity Affects Pain and Other Symptoms In Female Fibromyalgia Syndrome Patients. *J Musculoskeletal Pain*, 6(4), 5-22.
- Andreen, L., Nyberg, S., Turkmen, S., van Wingen, G. A., Fernández, G., et Bäckström, T. (2009). Sex steroid induced negative mood may be explained by the paradoxical effect mediated by GABAA modulators. *Psychoneuroendocrinology*, 34(8), 1121-1132.
- Andréen, L., Spigset, O., Andersson, A., Nyberg, S., et Bäckström, T. (2006). Pharmacokinetics of progesterone and its metabolites allopregnanolone and pregnanolone after oral administration of low-dose progesterone. *Maturitas*, 54 (3), 238-244
- Anthony, C. (2013). La douleur par l'hypnose Retrieved 24/03/2013, 2013, from <http://hypnosecret.com/la-douleur-par-lhypnose/>
- Aoki, Y., Takahashi, Y., Ohtori, S., Moriya, H., et Takahashi, K. (2004). Distribution and immunocytochemical characterization of dorsal root ganglion neurons innervating the lumbar intervertebral disc in rats: a review. *Life Sci*, 74(21), 2627-2642.
- Aouad, M., Charlet, A., Rodeau, J. L., et Poisbeau, P. (2009). Reduction and prevention of vincristine-induced neuropathic pain symptoms by the non-benzodiazepine anxiolytic etifoxine are mediated by 3alpha-reduced neurosteroids. *Pain*, 147(1-3), 54-59.
- Apkarian, A. V., Bushnell, M. C., Treede, R. D., et Zubieta, J. K. (2005). Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain*, 9(4), 463-484.
- Applegate, K. L., Keefe, F. J., Siegler, I. C., Bradley, L. A., McKee, D. C., Cooper, K. S., et al. (2005). Does personality at college entry predict number of reported pain conditions at mid-life? A longitudinal study. *J Pain*, 6(2), 92-97.
- Athanasoulia, A. P., Ising, M., Pfister, H., Mantzoros, C. S., Stalla, G. K., et Sievers, C. (2012). Distinct dopaminergic personality patterns in patients with prolactinomas: a comparison with nonfunctioning pituitary adenoma patients and age- and gender-matched controls. *Neuroendocrinology*, 96(3), 204-211.
- Bäckström, T., Haage, D., Löfgren, M., Johansson, I. M., Strömberg, J., Nyberg, S., et al. (2011). Paradoxical effects of GABA-A modulators may explain sex steroid induced negative mood symptoms in some persons. *Neuroscience*, 191 46-54
- Bar, K. J., Brehm, S., Boettger, M. K., Boettger, S., Wagner, G., et Sauer, H. (2005). Pain perception in major depression depends on pain modality. *Pain*, 117(1-2), 97-103.
- Barlow, D. H., Chorpita, B. F., et Turovsky, J. (1996). Fear, panic, anxiety, and disorders of emotion. *Nebr Symp Motiv*, 43, 251-328.
- Barnard, E. A., Skolnick, P., Olsen, R. W., Mohler, H., Sieghart, W., Biggio, G., et al. (1998). International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev*, 50(2), 291-313.
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., et Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139(2), 267-284.
- Basbaum, A. I., et Fields, H. L. (1979). The origin of descending pathways in the dorsolateral funiculus of the spinal cord of the cat and rat: further studies on the anatomy of pain modulation. *J Comp Neurol*, 187(3), 513-531.
- Basbaum, A. I., et Woolf, C. J. (1999). Pain. *Curr Biol*, 9(12), R429-R431.

- Baulieu, E. E. (1998). Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology*, 23(8), 963-987.
- Beato, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell*, 56(3), 335-344.
- Beck, A. T. (2010). *La thérapie cognitive et les troubles émotionnels*: De Boeck Supérieur.
- Beck, A. T., Steer, R. A., et Garbin, M. (1988). Psychometric properties of the Beck Depression Inventory: Twenty-five years of evaluation. *Clinical Psychology Review*, 8, 77-100.
- Beckmann, M., Johansen-Berg, H., et Rushworth, M. F. (2009). Connectivity-based parcellation of human cingulate cortex and its relation to functional specialization. *J Neurosci*, 29(4), 1175-1190.
- Behbehani, M. M., Jiang, M. R., Chandler, S. D., et Ennis, M. (1990). The effect of GABA and its antagonists on midbrain periaqueductal gray neurons in the rat. *Pain*, 40(2), 195-204.
- Behl, C., Skutella, T., Lezoualc'h, F., Post, A., Widmann, M., Newton, C. J., et al. (1997). Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol*, 51(4), 535-541.
- Belelli, D., Casula, A., Ling, A., et Lambert, J. J. (2002). The influence of subunit composition on the interaction of neurosteroids with GABA(A) receptors. *Neuropharmacology*, 43(4), 651-661.
- Belelli, D., Harrison, N. L., Maguire, J., Macdonald, R. L., Walker, M. C., et Cope, D. W. (2009). Extrasynaptic GABAA receptors: form, pharmacology, and function. *J Neurosci*, 29 (41), 12757-12763
- Belelli, D., Peden, D. R., Rosahl, T. W., Wafford, K. A., et Lambert, J. J. (2005). Extrasynaptic GABAA receptors of thalamocortical neurons: a molecular target for hypnotics. *J Neurosci*, 25 (50), 11513-11520.
- Bem, S. L. (1974). The measurement of psychological androgyny. *J Consult Clin Psychol*, 42(2), 155-162.
- Beninger, R. J. (1983). The role of dopamine in locomotor activity and learning. *Brain Res*, 287(2), 173-196.
- Bennett, R. M., Jones, J., Turk, D. C., Russell, I. J., et Matallana, L. (2007). An internet survey of 2,596 people with fibromyalgia. *BMC Musculoskelet Disord*, 8, 27.
- Berkley, K. J. (1997). Sex differences in pain. *Behav Brain Sci*, 20(3), 371-380;435-513.
- Bernard, J. F., Huang, G. F., et Besson, J. M. (1994). The parabrachial area: electrophysiological evidence for an involvement in visceral nociceptive processes. *J Neurophysiol*, 71(5), 1646-1660.
- Besson, J. M. (1990). *Serotonin and pain : proceedings of the International Symposium on Serotonin and Pain, held in La Roque-Gageac, from 17-21 September 1989* (Vol. 879). Amsterdam ; New York : New York, NY, USA.
- Besson, J. M., et Chaouch, A. (1987). Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol Rev*, 67(1), 67-186.
- Bethea, C. L. (1994). Regulation of progestin receptors in raphe neurons of steroid-treated monkeys. *Neuroendocrinology*, 60(1), 50-61.
- Biegon, A., Reches, A., Snyder, L., et McEwen, B. S. (1983). Serotonergic and noradrenergic receptors in the rat brain: modulation by chronic exposure to ovarian hormones. *Life Sci*, 32(17), 2015-2021.
- Bixo, M., Andersson, A., Winblad, B., Purdy, R. H., et Backstrom, T. (1997). Progesterone, 5alpha-pregnane-3,20-dione and 3alpha-hydroxy-5alpha-pregnane-20-one in

- specific regions of the human female brain in different endocrine states. *Brain Res*, 764(1-2), 173-178.
- Blackman, M. R., Muniyappa, R., Wilson, M., Moquin, B. E., Baldwin, H. L., Wong, K. A., *et al.* (2007). Diurnal secretion of growth hormone, cortisol, and dehydroepiandrosterone in pre- and perimenopausal women with active rheumatoid arthritis: a pilot case-control study. *Arthritis Res Ther*, 9(4), R73.
- Blackmore, P. F., Beebe, S. J., Danforth, D. R., *et al.* (1990). Progesterone and 17 alpha-hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J Biol Chem*, 265(3), 1376-1380.
- Blyth, F. M., March, L. M., Brnabic, A. J., Jorm, L. R., Williamson, M., *et al.* (2001). Chronic pain in Australia: a prevalence study. *Pain*, 89(2-3), 127-134.
- Bondy, B., Spaeth, M., Offenbaecher, M., Glatzeder, K., Stratz, T., Schwarz, M., *et al.* (1999). The T102C polymorphism of the 5-HT_{2A}-receptor gene in fibromyalgia. *Neurobiol Dis*, 6(5), 433-439.
- Borzan, J., *et al.* (2006). Organizational and activational effects of testosterone on carrageenan-induced inflammatory pain and morphine analgesia. *Neuroscience*, 143(3), 885-893.
- Bouchard, P., Dumont, Y., Fournier, A., St-Pierre, S., *et al.* (1993). Evidence for in vivo interactions between neuropeptide Y-related peptides and sigma receptors in the mouse hippocampal formation. *J Neurosci*, 13(9), 3926-3931.
- Bouchard, P., Maurice, T., St-Pierre, S., Privat, A., *et al.* (1997). Neuropeptide Y and the calcitonin gene-related peptide attenuate learning impairments induced by MK-801 via a sigma receptor-related mechanism. *Eur J Neurosci*, 9(10), 2142-2151.
- Bouhassira, D., Villanueva, L., Bing, Z., *et al.* (1992a). Involvement of the subnucleus reticularis dorsalis in diffuse noxious inhibitory controls in the rat. *Brain Res*, 595(2), 353-357.
- Bouhassira, D., Villanueva, L., *et al.* (1992b). Effects of systemic morphine on diffuse noxious inhibitory controls: role of the periaqueductal grey. *Eur J Pharmacol*, 216(2), 149-156.
- Bradshaw, H. B., *et al.* (2002). Estrogen replacement reverses ovariectomy-induced vaginal hyperalgesia in the rat. *Maturitas*, 41(2), 157-165.
- Brasseur, L., Chauvin, M., *et al.* (1997). *Douleurs : bases fondamentales, pharmacologie, douleurs aiguës, douleurs chroniques, thérapeutiques*. Paris: Maloine.
- Breton, J.-D., Veinante, P., Uhl-Bronner, S., Vergnano, A. M., Freund-Mercier, M. J., Schlichter, R., *et al.* (2008). Oxytocin-induced antinociception in the spinal cord is mediated by a subpopulation of glutamatergic neurons in lamina I-II which amplify GABAergic inhibition. *Mol Pain*, 4, 19.
- Brickley, S. G., Revilla, V., Cull-Candy, S. G., Wisden, W., *et al.* (2001). Adaptive regulation of neuronal excitability by a voltage-independent potassium conductance. *Nature*, 409(6816), 88-92.
- Brown, N., Kerby, J., Bonnert, T. P., Whiting, P. J., *et al.* (2002). Pharmacological characterization of a novel cell line expressing human alpha(4)beta(3)delta GABA(A) receptors. *Br J Pharmacol*, 136(7), 965-974.
- Brussaard, A. B., *et al.* (2003). Conditional regulation of neurosteroid sensitivity of GABA_A receptors. *Ann N Y Acad Sci*, 1007, 29-36.

- Brussaard, A. B., Wossink, J., Lodder, J. C., et Kits, K. S. (2000). Progesterone-metabolite prevents protein kinase C-dependent modulation of gamma-aminobutyric acid type A receptors in oxytocin neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 %6(7), 3625-3630 %&.
- Budai, D., et Fields, H. L. (1998). Endogenous opioid peptides acting at mu-opioid receptors in the dorsal horn contribute to midbrain modulation of spinal nociceptive neurons. *J Neurophysiol*, 79(2), 677-687.
- Budai, D., Harasawa, I., et Fields, H. L. (1998). Midbrain periaqueductal gray (PAG) inhibits nociceptive inputs to sacral dorsal horn nociceptive neurons through alpha2-adrenergic receptors. *J Neurophysiol*, 80(5), 2244-2254.
- Burgmer, M., Petzke, F., Giesecke, T., Gaubitz, M., Heuft, G., et Pfliegerer, B. (2011). Cerebral activation and catastrophizing during pain anticipation in patients with fibromyalgia. *Psychosom Med*, 73(9), 751-759.
- Buskila, D., Dan, B., Cohen, H., Hagit, C., Neumann, L., Lily, N., et al. (2004). An association between fibromyalgia and the dopamine D4 receptor exon III repeat polymorphism and relationship to novelty seeking personality traits. *Mol Psychiatry*, 9(8), 730-731.
- Butler, R. K., et Finn, D. P. (2009). Stress-induced analgesia. *Prog Neurobiol*, 88(3), 184-202.
- Caba, M., Gonzalez-Mariscal, G., et Beyer, C. (1994). Perispinal progestins enhance the antinociceptive effects of muscimol in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 47(1), 177-182.
- Callachan, H., Cottrell, G. A., Hather, N. Y., Lambert, J. J., Nooney, J. M., et Peters, J. A. (1987). Modulation of the GABAA receptor by progesterone metabolites. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 231(1264), 359-369.
- Calvino, B., et Grilo, R. M. (2006). Central pain control. *Joint Bone Spine*, 73(1), 10-16.
- Cameron, A. A., Khan, I. A., Westlund, K. N., et Willis, W. D. (1995). The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study. II. Descending projections. *J Comp Neurol*, 351(4), 585-601.
- Campbell, C. M., Witmer, K., Simango, M., Carteret, A., Loggia, M. L., Campbell, J. N., et al. (2010). Catastrophizing delays the analgesic effect of distraction. *Pain*, 149(2), 202-207.
- Carmona, L., Ballina, J., Gabriel, R., Laffon, A., et Group, E. S. (2001). The burden of musculoskeletal diseases in the general population of Spain: results from a national survey. *Ann Rheum Dis*, 60(11), 1040-1045.
- Carr, D. B., et Lipkowski, A. W. (1990). Neuropeptides and pain. *Agressologie*, 31(4), 173-177.
- Carstens, E., et Wilson, C. (1993). Rat tail flick reflex: magnitude measurement of stimulus-response function, suppression by morphine and habituation. *J Neurophysiol*, 70(2), 630-639.
- Caruso, D., Scurati, S., Maschi, O., De Angelis, L., Roglio, I., Giatti, S., et al. (2008). Evaluation of neuroactive steroid levels by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in central and peripheral nervous system: effect of diabetes. *Neurochem Int*, 52(4-5), 560-568.
- Cashin, M. F., et Moravsek, V. (1927). The physiological action of cholesterol. *Am J Physiol*, 82, 294-298.

- Chaban, V. V., Mayer, E. A., Ennes, H. S., et Micevych, P. E. (2003). Estradiol inhibits atp-induced intracellular calcium concentration increase in dorsal root ganglia neurons. *Neuroscience*, 118(4), 941-948.
- Chang, J. L., Peng, H. Y., Wu, H. C., Lu, H. T., Pan, S. F., Chen, M. J., et al. (2010). Acute neurosteroids inhibit the spinal reflex potentiation via GABAergic neurotransmission. *Am J Physiol Renal Physiol*, 299(1), F43-48.
- Chapman, C. R., et Gavrin, J. (1999). Suffering: the contributions of persistent pain. *Lancet*, 353(9171), 2233-2237.
- Chapman, V., et Dickenson, A. H. (1993). The effect of intrathecal administration of RP67580, a potent neurokinin 1 antagonist on nociceptive transmission in the rat spinal cord. *Neurosci Lett*, 157(2), 149-152.
- Charlet, A., Lasbennes, F., Darbon, P., et Poisbeau, P. (2008). Fast non-genomic effects of progesterone-derived neurosteroids on nociceptive thresholds and pain symptoms. *Pain*, 139(3), 603-609.
- Chen, A. C., et Treede, R. D. (1985). The McGill Pain Questionnaire in the assessment of phasic and tonic experimental pain: behavioral evaluation of the 'pain inhibiting pain' effect. *Pain*, 22(1), 67-79.
- Chen, L., Dai, X. N., et Sokabe, M. (2006). Chronic administration of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) primes for facilitated induction of long-term potentiation via sigma 1 (sigma1) receptor: optical imaging study in rat hippocampal slices. *Neuropharmacology*, 50(3), 380-392.
- Chen, S. C., et Wu, F. S. (2004). Mechanism underlying inhibition of the capsaicin receptor-mediated current by pregnenolone sulfate in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res*, 1027(1-2), 196-200.
- Cheng, Z. X., Lan, D. M., Wu, P. Y., Zhu, Y. H., Dong, Y., Ma, L., et al. (2008). Neurosteroid dehydroepiandrosterone sulphate inhibits persistent sodium currents in rat medial prefrontal cortex via activation of sigma-1 receptors. *Exp Neurol*, 210(1), 128-136.
- Chieng, B., et Christie, M. J. (1994). Inhibition by opioids acting on mu-receptors of GABAergic and glutamatergic postsynaptic potentials in single rat periaqueductal gray neurones in vitro. *Br J Pharmacol*, 113(1), 303-309.
- Chomicka, L. K. (1986). Effect of oestradiol on the responses of regional brain serotonin to stress in the ovariectomized rat. *J Neural Transm*, 67(3-4), 267-273.
- Clark, J. D., Rager, D. R., et Calpin, J. P. (1997). Animal well-being. II. Stress and distress. *Lab Anim Sci*, 47(6), 571-579.
- Clauw, D. J. (2009). Fibromyalgia: an overview. *Am J Med*, 122(12 Suppl), S3-S13.
- Cloninger, C. R., Svrakic, D. M., et Przybeck, T. R. (1993). A psychobiological model of temperament and character. *Arch Gen Psychiatry*, 50(12), 975-990.
- Commons, K. G., Aicher, S. A., Kow, L. M., et Pfaff, D. W. (2000). Presynaptic and postsynaptic relations of mu-opioid receptors to gamma-aminobutyric acid-immunoreactive and medullary-projecting periaqueductal gray neurons. *J Comp Neurol*, 419(4), 532-542.
- Commons, K. G., van Bockstaele, E. J., et Pfaff, D. W. (1999). Frequent colocalization of mu opioid and NMDA-type glutamate receptors at postsynaptic sites in periaqueductal gray neurons. *J Comp Neurol*, 408(4), 549-559.

- Condes-Lara, M., Rojas-Piloni, G., Martinez-Lorenzana, G., Rodriguez-Jimenez, J., Lopez Hidalgo, M., et Freund-Mercier, M. J. (2006). Paraventricular hypothalamic influences on spinal nociceptive processing. *Brain Res*, 1081(1), 126-137.
- Cone, R. I., Davis, G. A., et Goy, R. W. (1981). Effects of ovarian steroids on serotonin metabolism within grossly dissected and microdissected brain regions of the ovariectomized rat. *Brain Res Bull*, 7(6), 639-644.
- Cornil, C. A., Taziaux, M., Baillien, M., Ball, G. F., et Balthazart, J. (2006). Rapid effects of aromatase inhibition on male reproductive behaviors in Japanese quail. *Horm Behav*, 49(1), 45-67.
- Corpechot, C., Robel, P., Axelson, M., Sjovall, J., et Baulieu, E. E. (1981). Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(8), 4704-4707.
- Coulombe, M.-A., Potvin, S., Paul-Savoie, É., Corbin, J.-F., Gaumont, I., et Marchand, S. (Eds.). (2010). *Peripheral DHEA-S levels are decreased in fibromyalgia and negatively correlated with thermal hyperalgesia*. 13th World Congress on Pain.
- Coulombe, M. A., Marchand, S., et Poisbeau, P. (2011a). *Relationship between gonadal steroids and neurosteroids in modulation of stress-induced analgesia*. Paper presented at the 6th International Meeting: Steroids and Nervous System, Torino, Italy.
- Coulombe, M. A., Spooner, M. F., Gaumont, I., Carrier, J. C., et Marchand, S. (2011b). Estrogen receptors beta and alpha have specific pro- and anti-nociceptive actions. *Neuroscience*, 184, 172-182.
- Coutaux, A., Adam, F., Willer, J. C., et Le Bars, D. (2005). Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine*, 72(5), 359-371.
- Craig, A. D. (2003). A new view of pain as a homeostatic emotion. *Trends Neurosci*, 26(6), 303-307.
- Crofford, L. J., Engleberg, N. C., et Demitrack, M. A. (1996). Neurohormonal perturbations in fibromyalgia. *Baillieres Clin Rheumatol*, 10(2), 365-378.
- Crofford, L. J., Pillemer, S. R., Kalogeras, K. T., Cash, J. M., Michelson, D., Kling, M. A., et al. (1994). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis perturbations in patients with fibromyalgia. *Arthritis Rheum*, 37(11), 1583-1592.
- Crowley, W. R., O'Donohue, T. L., Muth, E. A., et Jacobowitz, D. M. (1979). Effects of ovarian hormones on levels of luteinizing hormone in plasma and on serotonin concentrations in discrete brain nuclei. *Brain Res Bull*, 4(4), 571-574.
- Cui, M., Feng, Y., McAdoo, D. J., et Willis, W. D. (1999). Periaqueductal gray stimulation-induced inhibition of nociceptive dorsal horn neurons in rats is associated with the release of norepinephrine, serotonin, and amino acids. *J Pharmacol Exp Ther*, 289(2), 868-876.
- Curtin, F., Walker, J. P., Peyrin, L., Soulier, V., Badan, M., et Schulz, P. (1997). Reward dependence is positively related to urinary monoamines in normal men. *Biol Psychiatry*, 42(4), 275-281.
- Cyr, D., et Fink, G. (2009). Mise au point du dosage salivaire de la testostérone et du cortisol par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. *Ann Biol Clin Qué*, 46(1), 30-35.
- Dado, R. J., Katter, J. T., et Giesler, G. J., Jr. (1994). Spinothalamic and spinohypothalamic tract neurons in the cervical enlargement of rats. II. Responses to innocuous and noxious mechanical and thermal stimuli. *J Neurophysiol*, 71(3), 981-1002.

- Davidson, E. M., Doursout, M. F., Szmuk, P., et Chelly, J. E. (2001). Antinociceptive and cardiovascular properties of esmolol following formalin injection in rats. *Can J Anaesth*, 48(1), 59-64.
- Davies, P. A., Hanna, M. C., Hales, T. G., et Kirkness, E. F. (1997). Insensitivity to anaesthetic agents conferred by a class of GABA(A) receptor subunit. *Nature*, 385(6619), 820-823.
- De Broucker, T., Cesaro, P., Willer, J. C., et Le Bars, D. (1990). Diffuse noxious inhibitory controls in man. Involvement of the spinoreticular tract. *Brain*, 113 (Pt 4), 1223-1234.
- de Souza, J. B., Potvin, S., Goffaux, P., Charest, J., et Marchand, S. (2009). The deficit of pain inhibition in fibromyalgia is more pronounced in patients with comorbid depressive symptoms. *Clin J Pain*, 25(2), 123-127.
- Debonnel, G., Bergeron, R., et de Montigny, C. (1996). Potentiation by dehydroepiandrosterone of the neuronal response to N-methyl-D-aspartate in the CA3 region of the rat dorsal hippocampus: an effect mediated via sigma receptors. *J Endocrinol*, 150 Suppl, S33-42.
- Denson, T. F., Pedersen, W. C., Ronquillo, J., et Nandy, A. S. (2009). The angry brain: neural correlates of anger, angry rumination, and aggressive personality. *J Cogn Neurosci*, 21(4), 734-744.
- Dessein, P. H., Shipton, E. A., Joffe, B. I., Hadebe, D. P., Stanwix, A. E., et Van der Merwe, B. A. (1999). Hyposecretion of adrenal androgens and the relation of serum adrenal steroids, serotonin and insulin-like growth factor-1 to clinical features in women with fibromyalgia. *Pain*, 83(2), 313-319.
- Devall, A. J., Liu, Z. W., et Lovick, T. A. (2009). Hyperalgesia in the setting of anxiety: sex differences and effects of the oestrous cycle in Wistar rats. *Psychoneuroendocrinology*, 34(4), 587-596.
- Devall, A. J., et Lovick, T. A. (2010). Differential activation of the periaqueductal gray by mild anxiogenic stress at different stages of the estrous cycle in female rats. *Neuropsychopharmacology*, 35(5), 1174-1185.
- Devor, M., Carmon, A., et Frostig, R. (1982). Primary afferent and spinal sensory neurons that respond to brief pulses of intense infrared laser radiation: a preliminary survey in rats. *Exp Neurol*, 76(3), 483-494.
- Di Paolo, T., Diagle, M., Picard, V., et Barden, N. (1983). Effect of acute and chronic 17 beta-estradiol treatment on serotonin and 5-hydroxyindole acetic acid content of discrete brain nuclei of ovariectomized rat. *Exp Brain Res*, 51(1), 73-76.
- Dickenson, A. H., et Le Bars, D. (1983). Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) involve trigeminothalamic and spinothalamic neurones in the rat. *Exp Brain Res*, 49(2), 174-180.
- Dixon, K. E., Thorn, B. E., et Ward, L. C. (2004). An evaluation of sex differences in psychological and physiological responses to experimentally-induced pain: a path analytic description. *Pain*, 112(1-2), 188-196.
- DonCarlos, L. L., Malik, K., et Morrell, J. I. (1995). Region-specific effects of ovarian hormones on estrogen receptor immunoreactivity. *Neuroreport*, 6(15), 2054-2058.
- Dubin, A. E., et Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest*, 120(11), 3760-3772.
- Dubrovsky, B. O. (2005). Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 29(2), 169-192.

- Dubuc, B. (2002a). La neuromatrice de la douleur. *Le cerveau à tous les niveaux* Retrieved 24/03/2013, 2013, from http://lecerveau.mcgill.ca/flash/i/i_03/i_03_cr/i_03_cr_dou/i_03_cr_dou.html
- Dubuc, B. (2002b). Les voies ascendantes de la douleur - avancé. *Le cerveau à tous les niveaux* Retrieved 24/03/2013, 2013, from http://lecerveau.mcgill.ca/flash/a/a_03/a_03_cl/a_03_cl_dou/a_03_cl_dou.html
- Dubuc, B. (2002c). Les voies ascendantes de la douleur - intermédiaire. *Le cerveau à tous les niveaux* Retrieved 24/03/2013, 2013, from http://lecerveau.mcgill.ca/flash/i/i_03/i_03_cl/i_03_cl_dou/i_03_cl_dou.html
- Eberhart, J. A., Morrell, J. I., Krieger, M. S., et Pfaff, D. W. (1985). An autoradiographic study of projections ascending from the midbrain central gray, and from the region lateral to it, in the rat. *J Comp Neurol*, 241(3), 285-310.
- Edinger, K. L., et Frye, C. A. (2004). Testosterone's analgesic, anxiolytic, and cognitive-enhancing effects may be due in part to actions of its 5alpha-reduced metabolites in the hippocampus. *Behav Neurosci*, 118(6), 1352-1364.
- Edwards, R. R., Smith, M. T., Stonerock, G., et Haythornthwaite, J. A. (2006). Pain-related catastrophizing in healthy women is associated with greater temporal summation of and reduced habituation to thermal pain. *Clin J Pain*, 22(8), 730-737.
- Esteve, R., Ramirez-Maestre, C., et Lopez-Marinez, A. E. (2007). Adjustment to chronic pain: the role of pain acceptance, coping strategies, and pain-related cognitions. *Ann Behav Med*, 33(2), 179-188.
- Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240(4854), 889-895.
- Evrard, H. C. (2006). Estrogen synthesis in the spinal dorsal horn: a new central mechanism for the hormonal regulation of pain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 291(2), R291-299.
- Farooqi, A., et Gibson, T. (1998). Prevalence of the major rheumatic disorders in the adult population of north Pakistan. *Br J Rheumatol*, 37(5), 491-495.
- Farrant, M., et Nusser, Z. (2005). Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci*, 6(3), 215-229.
- Fearon, I., McGrath, P. J., et Achat, H. (1996). 'Booboos': the study of everyday pain among young children. *Pain*, 68(1), 55-62.
- Fernandez, J., et Coello, M. T. (2010). Do the BSRI and PAQ really measure masculinity and femininity? *Span J Psychol*, 13(2), 1000-1009.
- French-Mullen, J. M. (1999). Interaction of 3beta, 5alpha-tetrahydrodeoxycorticosterone in rat and guinea-pig neurons: a comparison of Ca²⁺ - and GABA(A)-Cl⁻ -channel current modulation. *Steroids*, 64(1-2), 76-82.
- French-Mullen, J. M., Danks, P., et Spence, K. T. (1994). Neurosteroids modulate calcium currents in hippocampal CA1 neurons via a pertussis toxin-sensitive G-protein-coupled mechanism. *J Neurosci*, 14(4), 1963-1977.
- Fields, H. L., Heinricher, M. M., et Mason, P. (1991). Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annu Rev Neurosci*, 14, 219-245.
- Fillingim, R. B., et Gear, R. W. (2004). Sex differences in opioid analgesia: clinical and experimental findings. *Eur J Pain*, 8(5), 413-425.
- Fillingim, R. B., King, C. D., Ribeiro-Dasilva, M. C., Rahim-Williams, B., et Riley, J. L., 3rd. (2009). Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. *J Pain*, 10(5), 447-485.

- Finckh, A., Berner, I. C., Aubry-Rozier, B., et So, A. K. (2005). A randomized controlled trial of dehydroepiandrosterone in postmenopausal women with fibromyalgia. *J Rheumatol*, 32(7), 1336-1340.
- Finset, A., Overlie, I., et Holte, A. (2004). Musculo-skeletal pain, psychological distress, and hormones during the menopausal transition. *Psychoneuroendocrinology*, 29(1), 49-64.
- Floyd, N. S., Price, J. L., Ferry, A. T., Keay, K. A., et Bandler, R. (2000). Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. *J Comp Neurol*, 422(4), 556-578.
- Forman, L. J., Tingle, V., Estilow, S., et Cater, J. (1989). The response to analgesia testing is affected by gonadal steroids in the rat. *Life Sci*, 45(5), 447-454.
- Freitas, R. P., Lemos, T. M., Spyrides, M. H., et Sousa, M. B. (2012). Influence of cortisol and DHEA-S on pain and other symptoms in post menopausal women with fibromyalgia. *J Back Musculoskelet Rehabil*, 25(4), 245-252.
- Frye, C. A., et Duncan, J. E. (1994). Progesterone metabolites, effective at the GABAA receptor complex, attenuate pain sensitivity in rats. *Brain Res*, 643(1-2), 194-203.
- Frye, C. A., et Duncan, J. E. (1996). Estradiol benzoate potentiates neuroactive steroids' effects on pain sensitivity. *Pharmacol Biochem Behav*, 53(1), 27-32.
- Frye, C. A., et Seliga, A. M. (2001). Testosterone increases analgesia, anxiolysis, and cognitive performance of male rats. *Cogn Affect Behav Neurosci*, 1(4), 371-381.
- Frye, C. A., Van Keuren, K. R., Rao, P. N., et Erskine, M. S. (1996). Analgesic effects of the neurosteroid 3 alpha-androstanediol. *Brain Res*, 709(1), 1-9.
- Gallagher, D., Nies, G., et Thompson, L. W. (1982). Reliability of the Beck Depression Inventory with older adults. *J Consult Clin Psychol*, 50(1), 152-153.
- Gambhir, M., Mediratta, P. K., et Sharma, K. K. (2002). Evaluation of the analgesic effect of neurosteroids and their possible mechanism of action. *Indian J Physiol Pharmacol*, 46(2), 202-208.
- Garvey, M. J., Noyes, R., Jr., Cook, B., et Blum, N. (1996). Preliminary confirmation of the proposed link between reward-dependence traits and norepinephrine. *Psychiatry Res*, 65(1), 61-64.
- Gaumond, I., Arsenault, P., et Marchand, S. (2002). The role of sex hormones on formalin-induced nociceptive responses. *Brain Res*, 958(1), 139-145.
- Gaumond, I., Arsenault, P., et Marchand, S. (2005). Specificity of female and male sex hormones on excitatory and inhibitory phases of formalin-induced nociceptive responses. *Brain Res*, 1052(1), 105-111.
- Gauriau, C., et Bernard, J. F. (2002). Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Exp Physiol*, 87(2), 251-258.
- Gauthier, J., et Bouchard, S. (1993). Adaptation canadienne-française de la forme révisée du State-Trait Anxiety Inventory de Spielberger. *Revue canadienne des sciences du comportement*, 25(4), 559-578.
- Gebhart, G. F. (2004). Descending modulation of pain. *Neurosci Biobehav Rev*, 27(8), 729-737.
- Gee, K. W. (1988). Steroid modulation of the GABA/benzodiazepine receptor-linked chloride ionophore. *Mol Neurobiol*, 2(4), 291-317.
- George, O., Vallee, M., Le Moal, M., et Mayo, W. (2006). Neurosteroids and cholinergic systems: implications for sleep and cognitive processes and potential role of age-related changes. *Psychopharmacology (Berl)*, 186(3), 402-413.

- Giangrande, P. H., et McDonnell, D. P. (1999). The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Prog Horm Res*, 54, 291-313;313-294.
- Giesler, G. J. (1995). Evidence of direct nociceptive projections from the spinal cord to the hypothalamus and telencephalon. *Semin Neurosci*, 7, 253-261.
- Gilbert, A. K., et Franklin, K. B. (2001). GABAergic modulation of descending inhibitory systems from the rostral ventromedial medulla (RVM). Dose-response analysis of nociception and neurological deficits. *Pain*, 90(1-2), 25-36.
- Gilron, I., et Coderre, T. J. (1996). Preemptive analgesic effects of steroid anesthesia with alphaxalone in the rat formalin test. Evidence for differential GABA(A) Receptor modulation in persistent nociception. *Anesthesiology*, 84(3), 572-579.
- Goffaux, P., Redmond, W. J., Rainville, P., et Marchand, S. (2007). Descending analgesia--when the spine echoes what the brain expects. *Pain*, 130(1-2), 137-143.
- Goodman, L. S., Hardman, J. G., Limbird, L. E., et Gilman, A. G. (2001a). *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics* (Vol. 10th %6). New York: McGraw-Hill.
- Goodman, L. S., Hardman, J. G., Limbird, L. E., et Gilman, A. G. (2001b). *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics* (Vol. 10th). New York: McGraw-Hill.
- Grammatopoulos, D. K., et Chrousos, G. P. (2002). Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends Endocrinol Metab*, 13(10), 436-444.
- Gray, T. S., et Magnuson, D. J. (1992). Peptide immunoreactive neurons in the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis project to the midbrain central gray in the rat. *Peptides*, 13(3), 451-460.
- Greenspan, F. S., et Gardner, D. G. (2004). *Basic & clinical endocrinology* (Vol. 7th %6). New York ; Toronto: Lange Medical Books/McGraw-Hill.
- Griffiths, J., et Lovick, T. (2005a). Withdrawal from progesterone increases expression of alpha4, beta1, and delta GABA(A) receptor subunits in neurons in the periaqueductal gray matter in female Wistar rats. *J Comp Neurol*, 486(1), 89-97.
- Griffiths, J. L., et Lovick, T. A. (2005b). GABAergic neurones in the rat periaqueductal grey matter express alpha4, beta1 and delta GABAA receptor subunits: plasticity of expression during the estrous cycle. *Neuroscience*, 136(2), 457-466.
- Guazzo, E. P., Kirkpatrick, P. J., Goodyer, I. M., Shiers, H. M., et Herbert, J. (1996). Cortisol, dehydroepiandrosterone (DHEA), and DHEA sulfate in the cerebrospinal fluid of man: relation to blood levels and the effects of age. *J Clin Endocrinol Metab*, 81(11), 3951-3960.
- Guirimand, F., et Le Bars, D. (1996). [Physiology of nociception]. *Ann Fr Anesth Reanim*, 15(7), 1048-1079.
- Gulinello, M., Gong, Q. H., Li, X., et Smith, S. S. (2001). Short-term exposure to a neuroactive steroid increases alpha4 GABA(A) receptor subunit levels in association with increased anxiety in the female rat. *Brain Res*, 910(1-2), 55-66.
- Gulinello, M., Gong, Q. H., et Smith, S. S. (2002). Progesterone withdrawal increases the alpha4 subunit of the GABA(A) receptor in male rats in association with anxiety and altered pharmacology - a comparison with female rats. *Neuropharmacology*, 43(4), 701-714.

- Gutstein, H. B., Mansour, A., Watson, S. J., Akil, H., et Fields, H. L. (1998). Mu and kappa opioid receptors in periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. *Neuroreport*, 9(8), 1777-1781.
- Haas, K. F., et Macdonald, R. L. (1999). GABAA receptor subunit gamma2 and delta subtypes confer unique kinetic properties on recombinant GABAA receptor currents in mouse fibroblasts. *J Physiol*, 514 (Pt 1), 27-45.
- Handa, R. J., Kerr, J. E., DonCarlos, L. L., McGivern, R. F., et Hejna, G. (1996). Hormonal regulation of androgen receptor messenger RNA in the medial preoptic area of the male rat. *Brain Res Mol Brain Res*, 39(1-2), 57-67.
- Hansenne, M. (2001). Le modèle biosocial de la personnalité de Cloninger *L'année psychologique*, 101(1), 155-181.
- Hansenne, M., et Ansseau, M. (1999). Harm avoidance and serotonin. *Biol Psychol*, 51(1), 77-81.
- Hansenne, M., et Bianchi, J. (2009). Emotional intelligence and personality in major depression: trait versus state effects. *Psychiatry Res*, 166(1), 63-68.
- Hansenne, M., Reggers, J., Pinto, E., Kjiri, K., Ajamier, A., et Ansseau, M. (1999). Temperament and character inventory (TCI) and depression. *J Psychiatr Res*, 33(1), 31-36.
- Harris, R. E. (2010). Elevated excitatory neurotransmitter levels in the fibromyalgia brain. *Arthritis Res Ther*, 12(5), 141.
- Harrison, N. L., Majewska, M. D., Harrington, J. W., et Barker, J. L. (1987). Structure-activity relationships for steroid interaction with the gamma-aminobutyric acidA receptor complex. *J Pharmacol Exp Ther*, 241(1), 346-353.
- Hasanein, P., Mirazi, N., et Javanmardi, K. (2008). GABAA receptors in the central nucleus of amygdala (CeA) affect on pain modulation. *Brain Res*, 1241, 36-41.
- Hasselhorn, H. M., Theorell, T., et Vingard, E. (2001). Endocrine and immunologic parameters indicative of 6-month prognosis after the onset of low back pain or neck/shoulder pain. *Spine (Phila Pa 1976)*, 26(3), E24-29.
- Hassett, A. L., Cone, J. D., Patella, S. J., et Sigal, L. H. (2000). The role of catastrophizing in the pain and depression of women with fibromyalgia syndrome. *Arthritis Rheum*, 43(11), 2493-2500.
- Hau, M., Dominguez, O. A., et Evrard, H. C. (2004). Testosterone reduces responsiveness to nociceptive stimuli in a wild bird. *Horm Behav*, 46(2), 165-170.
- Havelock, J. C., Auchus, R. J., et Rainey, W. E. (2004). The rise in adrenal androgen biosynthesis: adrenarche. *Semin Reprod Med*, 22(4), 337-347.
- Hayashi, T., Maurice, T., et Su, T. P. (2000). Ca(2+) signaling via sigma(1)-receptors: novel regulatory mechanism affecting intracellular Ca(2+) concentration. *J Pharmacol Exp Ther*, 293(3), 788-798.
- Hayashi, T., et Su, T.-P. (2004a). Sigma-1 receptors at galactosylceramide-enriched lipid microdomains regulate oligodendrocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(41), 14949-14954.
- Hayashi, T., et Su, T. P. (2004b). Sigma-1 receptor ligands: potential in the treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS Drugs*, 18(5), 269-284.
- Heim, C., Newport, D. J., Bonsall, R., Miller, A. H., et Nemeroff, C. B. (2001). Altered pituitary-adrenal axis responses to provocative challenge tests in adult survivors of childhood abuse. *Am J Psychiatry*, 158(4), 575-581.

- Heinricher, M. M., Haws, C. M., et Fields, H. L. (1991). Evidence for GABA-mediated control of putative nociceptive modulating neurons in the rostral ventromedial medulla: iontophoresis of bicuculline eliminates the off-cell pause. *Somatosens Mot Res*, 8(3), 215-225.
- Heinricher, M. M., et Kaplan, H. J. (1991). GABA-mediated inhibition in rostral ventromedial medulla: role in nociceptive modulation in the lightly anesthetized rat. *Pain*, 47(1), 105-113.
- Heinricher, M. M., Tavares, I., Leith, J. L., et Lumb, B. M. (2009). Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res Rev*, 60(1), 214-225.
- Herbert, H., Moga, M. M., et Saper, C. B. (1990). Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *J Comp Neurol*, 293(4), 540-580.
- Herd, M. B., Belelli, D., et Lambert, J. J. (2007). Neurosteroid modulation of synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors. *Pharmacol Ther*, 116(1), 20-34.
- Herren, R. G. H. (1933). The effect of high and low female sex hormone concentration on the two-point threshold of pain and touch and upon tactile sensitivity. *J. Exp. Psychol.*, 16, 324-327.
- Himmel, P. B., et Seligman, T. M. (1999). A pilot study employing Dehydroepiandrosterone (DHEA) in the treatment of chronic fatigue syndrome. *J Clin Rheumatol*, 5(2), 56-59.
- Hodge, C. W., Mehmert, K. K., Kelley, S. P., McMahan, T., Haywood, A., Olive, M. F., et al. (1999). Supersensitivity to allosteric GABA(A) receptor modulators and alcohol in mice lacking PKCepsilon. *Nat Neurosci*, 2(11), 997-1002.
- Hodge, C. W., Raber, J., McMahan, T., Walter, H., Sanchez-Perez, A. M., Olive, M. F., et al. (2002). Decreased anxiety-like behavior, reduced stress hormones, and neurosteroid supersensitivity in mice lacking protein kinase Cepsilon. *J Clin Invest*, 110(7), 1003-1010.
- Horak, M., Vlcek, K., Chodounska, H., et Vyklicky, L., Jr. (2006). Subtype-dependence of N-methyl-D-aspartate receptor modulation by pregnenolone sulfate. *Neuroscience*, 137(1), 93-102.
- Hosie, A. M., Wilkins, M. E., da Silva, H. M. A., et Smart, T. G. (2006). Endogenous neurosteroids regulate GABA(A) receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature*, 444(7118), 486-489.
- Houghton, L. A., Lea, R., Jackson, N., et Whorwell, P. J. (2002). The menstrual cycle affects rectal sensitivity in patients with irritable bowel syndrome but not healthy volunteers. *Gut*, 50(4), 471-474.
- Hrabovszky, E., Kallo, I., Hajszan, T., Shughrue, P. J., Merchenthaler, I., et Liposits, Z. (1998). Expression of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid in oxytocin and vasopressin neurons of the rat supraoptic and paraventricular nuclei. *Endocrinology*, 139(5), 2600-2604.
- Hsieh, A. Y., Tripp, D. A., Ji, L. J., et Sullivan, M. J. (2010). Comparisons of catastrophizing, pain attitudes, and cold-pressor pain experience between Chinese and European Canadian young adults. *J Pain*, 11(11), 1187-1194.
- Hubscher, C. H., Fell, J. D., et Gupta, D. S. (2010). Sex and hormonal variations in the development of at-level allodynia in a rat chronic spinal cord injury model. *Neurosci Lett*, 477(3), 153-156.
- IASP. (1994). *Classification of Chronic Pain*: IASP Press, Seattle.

- Imbe, H., Iwai-Liao, Y., et Senba, E. (2006). Stress-induced hyperalgesia: animal models and putative mechanisms. *Front Biosci*, *11*, 2179-2192.
- Irachabal, S., Koleck, M., Rascle, N., et Bruchon-Schweitzer, M. (2008). [Pain coping strategies: French adaptation of the coping strategies questionnaire (CSQ-F)]. *Encephale*, *34*(1), 47-53.
- Irwin, S., Houde, R. W., Bennett, D. R., Hendershot, L. C., et Seevers, M. H. (1951). The effects of morphine methadone and meperidine on some reflex responses of spinal animals to nociceptive stimulation. *J Pharmacol Exp Ther*, *101*(2), 132-143.
- Johansson, T., Frändberg, P.-A., Nyberg, F., et Grevès, P. L. (2008). Molecular mechanisms for nanomolar concentrations of neurosteroids at NR1/NR2B receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, *324*(2), 759-768.
- Johnson, M. D., et Crowley, W. R. (1983). Acute effects of estradiol on circulating luteinizing hormone and prolactin concentrations and on serotonin turnover in individual brain nuclei. *Endocrinology*, *113*(6), 1935-1941.
- Julien, N., Goffaux, P., Arsenault, P., et Marchand, S. (2005). Widespread pain in fibromyalgia is related to a deficit of endogenous pain inhibition. *Pain*, *114*(1-2), 295-302.
- Julius, D., et Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, *413*(6852), 203-210.
- Kalimi, M., Shafagoj, Y., Loria, R., Padgett, D., et Regelson, W. (1994). Anti-glucocorticoid effects of dehydroepiandrosterone (DHEA). *Molecular and Cellular Biochemistry*, *131*(2), 99-104.
- Kato, K., Sullivan, P. F., Evengard, B., et Pedersen, N. L. (2006). Importance of genetic influences on chronic widespread pain. *Arthritis Rheum*, *54*(5), 1682-1686.
- Kato, Y., Kowalski, C. J., et Stohler, C. S. (2001). Habituation of the early pain-specific respiratory response in sustained pain. *Pain*, *91*(1-2), 57-63.
- Kavaliers, M., et Wiebe, J. P. (1987). Analgesic effects of the progesterone metabolite, 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one, and possible modes of action in mice. *Brain Res*, *415*(2), 393-398.
- Kawata, M. (1995). Roles of steroid hormones and their receptors in structural organization in the nervous system. *Neurosci Res*, *24*(1), 1-46.
- Kazantseva, A. V., Gaisina, D. A., Malykh, S. B., et Khusnutdinova, E. K. (2009). [Role of dopamine transporter gene (DAT1) polymorphisms in personality traits variation]. *Genetika*, *45*(8), 1110-1117.
- Ke, F. C., et Ramirez, V. D. (1990). Binding of progesterone to nerve cell membranes of rat brain using progesterone conjugated to 125I-bovine serum albumin as a ligand. *J Neurochem*, *54* (2), 467-472.
- Keay, K. A., et Bandler, R. (2001). Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. *Neurosci Biobehav Rev*, *25*(7-8), 669-678.
- Keay, K. A., Clement, C. I., Depaulis, A., et Bandler, R. (2001). Different representations of inescapable noxious stimuli in the periaqueductal gray and upper cervical spinal cord of freely moving rats. *Neurosci Lett*, *313*(1-2), 17-20.
- Keefe, F. J., Lefebvre, J. C., Egert, J. R., Affleck, G., Sullivan, M. J., et Caldwell, D. S. (2000). The relationship of gender to pain, pain behavior, and disability in osteoarthritis patients: the role of catastrophizing. *Pain*, *87*(3), 325-334.

- Kelly, M. J., Moss, R. L., et Dudley, C. A. (1977). The effects of microelectrophoretically applied estrogen, cortisol and acetylcholine on medial preoptic-septal unit activity throughout the estrous cycle of the female rat. *Exp Brain Res*, 30(1), 53-64.
- Kibaly, C., Meyer, L., Patte-Mensah, C., et Mensah-Nyagan, A. G. (2008). Biochemical and functional evidence for the control of pain mechanisms by dehydroepiandrosterone endogenously synthesized in the spinal cord. *FASEB J*, 22(1), 93-104.
- Kilts, J. D., Tupler, L. A., Keefe, F. J., Payne, V. M., Hamer, R. M., Naylor, J. C., et al. (2010). Neurosteroids and self-reported pain in veterans who served in the U.S. Military after September 11, 2001. *Pain Med*, 11(10), 1469-1476.
- Kim, H. W., Kwon, Y. B., Roh, D. H., Yoon, S. Y., Han, H. J., Kim, K. W., et al. (2006). Intrathecal treatment with sigma1 receptor antagonists reduces formalin-induced phosphorylation of NMDA receptor subunit 1 and the second phase of formalin test in mice. *Br J Pharmacol*, 148(4), 490-498.
- Kim, H. W., Roh, D. H., Yoon, S. Y., Seo, H. S., Kwon, Y. B., Han, H. J., et al. (2008). Activation of the spinal sigma-1 receptor enhances NMDA-induced pain via PKC- and PKA-dependent phosphorylation of the NR1 subunit in mice. *Br J Pharmacol*, 154(5), 1125-1134.
- King, C. D., Wong, F., Currie, T., Mauderli, A. P., Fillingim, R. B., et Riley, J. L., 3rd. (2009). Deficiency in endogenous modulation of prolonged heat pain in patients with Irritable Bowel Syndrome and Temporomandibular Disorder. *Pain*, 143(3), 172-178.
- Kirschbaum, C., et Hellhammer, D. H. (1994). Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: recent developments and applications. *Psychoneuroendocrinology*, 19(4), 313-333.
- Kivimaki, M., Leino-Arjas, P., Virtanen, M., Elovainio, M., Keltikangas-Jarvinen, L., Puttonen, S., et al. (2004). Work stress and incidence of newly diagnosed fibromyalgia: prospective cohort study. *J Psychosom Res*, 57(5), 417-422.
- Klimek, A. (1985). Use of testosterone in the treatment of cluster headache. *Eur Neurol*, 24(1), 53-56.
- Koch, H. (1986). *The management of chronic pain in office-based ambulatory care: National Ambulatory Medical Care Survey*. Hyattsville, MD: DHHS publ. no. (PHS) 86-1250.
- Koch, M. (1990). Effects of treatment with estradiol and parental experience on the number and distribution of estrogen-binding neurons in the ovariectomized mouse brain. *Neuroendocrinology*, 51(5), 505-514.
- Koksma, J. J., van Kesteren, R. E., Rosahl, T. W., Zwart, R., Smit, A. B., Luddens, H., et al. (2003). Oxytocin regulates neurosteroid modulation of GABA(A) receptors in supraoptic nucleus around parturition. *J Neurosci*, 23(3), 788-797.
- Kondo, D., Saegusa, H., Yabe, R., Takasaki, I., Kurihara, T., Zong, S., et al. (2009). Peripheral-type benzodiazepine receptor antagonist is effective in relieving neuropathic pain in mice. *J Pharmacol Sci*, 110(1), 55-63.
- Korte, S. M., Koolhaas, J. M., Wingfield, J. C., et McEwen, B. S. (2005). The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neurosci Biobehav Rev*, 29(1), 3-38.

- Kraus, E., Le Bars, D., et Besson, J. M. (1981). Behavioral confirmation of "diffuse noxious inhibitory controls" (DNIC) and evidence for a role of endogenous opiates. *Brain Res*, 206(2), 495-499.
- Kraus, W. L., Weis, K. E., et Katzenellenbogen, B. S. (1995). Inhibitory cross-talk between steroid hormone receptors: differential targeting of estrogen receptor in the repression of its transcriptional activity by agonist- and antagonist-occupied progestin receptors. *Mol Cell Biol*, 15(4), 1847-1857.
- Kuba, T., et Quinones-Jenab, V. (2005). The role of female gonadal hormones in behavioral sex differences in persistent and chronic pain: clinical versus preclinical studies. *Brain Res Bull*, 66(3), 179-188.
- Kuba, T., Wu, H.-B. K., Nazarian, A., Festa, E. D., Barr, G. A., Jenab, S., et al. (2006). Estradiol and progesterone differentially regulate formalin-induced nociception in ovariectomized female rats. *Horm Behav*, 49(4), 441-449.
- Kumazawa, T. (1990). Functions of the nociceptive primary neurons. *Jpn J Physiol*, 40(1), 1-14.
- Ladisich, W. (1974). Effect of progesterone on regional 5-hydroxytryptamine metabolism in the rat brain. *Neuropharmacology*, 13(9), 877-883.
- Larivière, M., Goffaux, P., Marchand, S., et Julien, N. (2007). Changes in pain perception and descending inhibitory controls start at middle age in healthy adults. *Clin J Pain*, 23(6), 506-510.
- Lauber, A. H., Mobbs, C. V., Muramatsu, M., et Pfaff, D. W. (1991). Estrogen receptor messenger RNA expression in rat hypothalamus as a function of genetic sex and estrogen dose. *Endocrinology*, 129(6), 3180-3186.
- Le Bars, D. (2002). The whole body receptive field of dorsal horn multireceptive neurones. *Brain Res Brain Res Rev*, 40(1-3), 29-44.
- Le Bars, D., Chitour, D., et Clot, A. M. (1981a). The encoding of thermal stimuli by diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). *Brain Res*, 230(1-2), 394-399.
- Le Bars, D., Chitour, D., Kraus, E., Dickenson, A. H., et Besson, J. M. (1981b). Effect of naloxone upon diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) in the rat. *Brain Res*, 204(2), 387-402.
- Le Bars, D., Dickenson, A. H., et Besson, J. M. (1979). Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). II. Lack of effect on non-convergent neurones, supraspinal involvement and theoretical implications. *Pain*, 6(3), 305-327.
- Le Bars, D., Gozariu, M., et Cadden, S. W. (2001). Animal models of nociception. *Pharmacol Rev*, 53(4), 597-652.
- Leo, S., Straetemans, R., D'Hooge, R., et Meert, T. (2008). Differences in nociceptive behavioral performance between C57BL/6J, 129S6/SvEv, B6 129 F1 and NMRI mice. *Behav Brain Res*, 190(2), 233-242.
- Leonard, G., Goffaux, P., Mathieu, D., Blanchard, J., Kenny, B., et Marchand, S. (2009). Evidence of descending inhibition deficits in atypical but not classical trigeminal neuralgia. *Pain*, 147(1-3), 217-223.
- Leonelli, E., Bianchi, R., Cavaletti, G., Caruso, D., Crippa, D., Garcia-Segura, L. M., et al. (2007). Progesterone and its derivatives are neuroprotective agents in experimental diabetic neuropathy: a multimodal analysis. *Neuroscience*, 144(4), 1293-1304.
- Leowattana, W. (2004). DHEAS as a new diagnostic tool. *Clin Chim Acta*, 341(1-2), 1-15.

- LeResche, L., Mancl, L., Sherman, J. J., Gandara, B., et Dworkin, S. F. (2003). Changes in temporomandibular pain and other symptoms across the menstrual cycle. *Pain*, 106(3), 253-261.
- Lévesque, L., Desharnais, R., et Godin, G. (1995). Validation française du self-control schedule. *Science et Comportement*, 24(2), 133-149.
- Lewis, J. W., Tordoff, M. G., Sherman, J. E., et Liebeskind, J. C. (1982). Adrenal medullary enkephalin-like peptides may mediate opioid stress analgesia. *Science*, 217(4559), 557-559.
- Liao, D., Barnes, R. W., Chambless, L. E., Simpson, R. J., Jr., Sorlie, P., et Heiss, G. (1995). Age, race, and sex differences in autonomic cardiac function measured by spectral analysis of heart rate variability--the ARIC study. *Atherosclerosis Risk in Communities. Am J Cardiol*, 76(12), 906-912.
- Lin, Q., Peng, Y. B., et Willis, W. D. (1996a). Antinociception and inhibition from the periaqueductal gray are mediated in part by spinal 5-hydroxytryptamine(1A) receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 276(3), 958-967.
- Lin, Q., Peng, Y. B., et Willis, W. D. (1996b). Inhibition of primate spinothalamic tract neurons by spinal glycine and GABA is reduced during central sensitization. *J Neurophysiol*, 76(2), 1005-1014.
- Lin, Q., Peng, Y. B., et Willis, W. D. (1996c). Role of GABA receptor subtypes in inhibition of primate spinothalamic tract neurons: difference between spinal and periaqueductal gray inhibition. *J Neurophysiol*, 75(1), 109-123.
- Lin, S. C., Wu, P. L., Ko, H. C., Wu, J. Y., Huang, S. Y., Lin, W. W., et al. (2007). Specific personality traits and dopamine, serotonin genes in anxiety-depressive alcoholism among Han Chinese in Taiwan. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 31(7), 1526-1534.
- Lindell, L., Bergman, S., Petersson, I. F., Jacobsson, L. T., et Herrstrom, P. (2000). Prevalence of fibromyalgia and chronic widespread pain. *Scand J Prim Health Care*, 18(3), 149-153.
- Lovick, T. A., et Devall, A. J. (2009). Progesterone withdrawal-evoked plasticity of neural function in the female periaqueductal grey matter. *Neural Plast*, 2009, 730902.
- Loyd, D. R., et Murphy, A. Z. (2006). Sex differences in the anatomical and functional organization of the periaqueductal gray-rostral ventromedial medullary pathway in the rat: a potential circuit mediating the sexually dimorphic actions of morphine. *J Comp Neurol*, 496(5), 723-738.
- Loyd, D. R., et Murphy, A. Z. (2008). Androgen and estrogen (alpha) receptor localization on periaqueductal gray neurons projecting to the rostral ventromedial medulla in the male and female rat. *J Chem Neuroanat*, 36(3-4), 216-226.
- Lumb, B. M. (2002). Inescapable and escapable pain is represented in distinct hypothalamic-midbrain circuits: specific roles for Delta- and C-nociceptors. *Exp Physiol*, 87(2), 281-286.
- Lumb, B. M., Parry, D. M., Semenenko, F. M., McMullan, S., et Simpson, D. A. A. (2002). C-nociceptor activation of hypothalamic neurones and the columnar organisation of their projections to the periaqueductal grey in the rat. *Exp Physiol*, 87(2), 123-128.
- Lyoo, K., Gunderson, J. G., et Phillips, K. A. (1998). Personality dimensions associated with depressive personality disorder. *J Pers Disord*, 12(1), 46-55.

- MacLennan, A. J., Drugan, R. C., Hyson, R. L., Maier, S. F., Madden, J. t., et Barchas, J. D. (1982). Corticosterone: a critical factor in an opioid form of stress-induced analgesia. *Science*, 215(4539), 1530-1532.
- MacLusky, N. J., Walters, M. J., Clark, A. S., et Toran-Allerand, C. D. (1994). Aromatase in the cerebral cortex, hippocampus, and mid-brain: ontogeny and developmental implications. *Mol Cell Neurosci*, 5(6), 691-698.
- Maguire, J., Ferando, I., Simonsen, C., et Mody, I. (2009). Excitability changes related to GABAA receptor plasticity during pregnancy. *J Neurosci*, 29(30), 9592-9601.
- Maguire, J., et Mody, I. (2007). Neurosteroid synthesis-mediated regulation of GABA(A) receptors: relevance to the ovarian cycle and stress. *J Neurosci*, 27 %6(9), 2155-2162 %&.
- Maguire, J., et Mody, I. (2009). Steroid hormone fluctuations and GABA(A)R plasticity. *Psychoneuroendocrinology*, 34 Suppl 1 %6, S84-S90 %&.
- Maguire, J. L., Stell, B. M., Rafizadeh, M., et Mody, I. (2005). Ovarian cycle-linked changes in GABA(A) receptors mediating tonic inhibition alter seizure susceptibility and anxiety. *Nat Neurosci*, 8(6), 797-804.
- Majewska, M. D., Harrison, N. L., Schwartz, R. D., Barker, J. L., et Paul, S. M. (1986). Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science*, 232(4753), 1004-1007.
- Majewska, M. D., Mienville, J. M., et Vicini, S. (1988). Neurosteroid pregnenolone sulfate antagonizes electrophysiological responses to GABA in neurons. *Neurosci Lett*, 90(3), 279-284.
- Majewska, M. D., et Schwartz, R. D. (1987). Pregnenolone-sulfate: an endogenous antagonist of the gamma-aminobutyric acid receptor complex in brain? *Brain Res*, 404(1-2), 355-360.
- Malmberg, A. B., Chen, C., Tonegawa, S., et Basbaum, A. I. (1997). Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKCgamma. *Science*, 278(5336), 279-283.
- Maninger, N., Wolkowitz, O. M., Reus, V. I., Epel, E. S., et Mellon, S. H. (2009). Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). *Front Neuroendocrinol*, 30(1), 65-91.
- Marchand, S. (1998). *Le phénomène de la douleur*: Chenelière Éducation.
- Marek, P., Mogil, J. S., Sternberg, W. F., Panocka, I., et Liebeskind, J. C. (1992). N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor antagonist MK-801 blocks non-opioid stress-induced analgesia. II. Comparison across three swim-stress paradigms in selectively bred mice. *Brain Res*, 578(1-2), 197-203.
- Marek, P., Page, G. G., Ben-Eliyahu, S., et Liebeskind, J. C. (1991). N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor antagonist MK-801 blocks non-opioid stress-induced analgesia. I. Comparison of opiate receptor-deficient and opiate receptor-rich strains of mice. *Brain Res*, 551(1-2), 293-296.
- Martinez-Lavin, M. (2012). Fibromyalgia: When Distress Becomes (Un)sympathetic Pain. *Pain Res Treat*, 2012, 981565.
- Maurice, T. (2001). Beneficial effect of the sigma(1) receptor agonist PRE-084 against the spatial learning deficits in aged rats. *Eur J Pharmacol*, 431(2), 223-227.
- Maurice, T., Grégoire, C., et Espallergues, J. (2006). Neuro(active)steroids actions at the neuromodulatory sigma1 (sigma1) receptor: biochemical and physiological

- evidences, consequences in neuroprotection. *Pharmacol Biochem Behav*, 84(4), 581-597.
- Maurice, T., Hiramatsu, M., Itoh, J., Kameyama, T., Hasegawa, T., et Nabeshima, T. (1994). Behavioral evidence for a modulating role of sigma ligands in memory processes. I. Attenuation of dizocilpine (MK-801)-induced amnesia. *Brain Res*, 647(1), 44-56.
- Maurice, T., Roman, F. J., et Privat, A. (1996). Modulation by neurosteroids of the in vivo (+)-[3H]SKF-10,047 binding to sigma 1 receptors in the mouse forebrain. *J Neurosci Res*, 46(6), 734-743.
- Maurice, T., et Su, T. P. (2009). The pharmacology of sigma-1 receptors. *Pharmacol Ther*, 124(2), 195-206.
- McCrae, R. R., et John, O. P. (1992). An introduction to the five-factor model and its applications. *J Pers*, 60(2), 175-215.
- McDermid, A. J., Rollman, G. B., et McCain, G. A. (1996). Generalized hypervigilance in fibromyalgia: evidence of perceptual amplification. *Pain*, 66(2-3), 133-144.
- McEwen, B. S. (1991). Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends Pharmacol Sci*, 12(4), 141-147.
- McEwen, B. S. (1994). Steroid hormone actions on the brain: when is the genome involved? *Horm Behav*, 28(4), 396-405.
- McEwen, B. S. (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev*, 87(3), 873-904.
- McEwen, B. S., et Alves, S. E. (1999). Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev*, 20(3), 279-307.
- McEwen, B. S., et Kalia, M. (2010). The role of corticosteroids and stress in chronic pain conditions. *Metabolism*, 59 Suppl 1, S9-15.
- McEwen, B. S., et Wingfield, J. C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav*, 43(1), 2-15.
- McGowan, M. K., et Hammond, D. L. (1993). Antinociception produced by microinjection of L-glutamate into the ventromedial medulla of the rat: mediation by spinal GABAA receptors. *Brain Res*, 620(1), 86-96.
- Mechlin, B., Morrow, A. L., Maixner, W., et Girdler, S. S. (2007). The relationship of allopregnanolone immunoreactivity and HPA-axis measures to experimental pain sensitivity: Evidence for ethnic differences. *Pain*, 131(1-2), 142-152.
- Mei, J., et Pasternak, G. W. (2002). Sigma1 receptor modulation of opioid analgesia in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther*, 300(3), 1070-1074.
- Melcangi, R. C., Azcoitia, I., Ballabio, M., Cavarretta, I., Gonzalez, L. C., Leonelli, E., et al. (2003). Neuroactive steroids influence peripheral myelination: a promising opportunity for preventing or treating age-dependent dysfunctions of peripheral nerves. *Prog Neurobiol*, 71(1), 57-66.
- Melcangi, R. C., Magnaghi, V., Galbiati, M., Ghelarducci, B., Sebastiani, L., et Martini, L. (2000). The action of steroid hormones on peripheral myelin proteins: a possible new tool for the rebuilding of myelin? *J Neurocytol*, 29(5-6), 327-339.
- Mellon, S. H., et Griffin, L. D. (2002). Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol Metab*, 13(1), 35-43.
- Mellon, S. H., Griffin, L. D., et Compagnone, N. A. (2001). Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain Res Brain Res Rev*, 37(1-3), 3-12.

- Melzack, R. (1975). The McGill Pain Questionnaire: major properties and scoring methods. *Pain*, 1(3), 277-299.
- Melzack, R. (2005). The McGill pain questionnaire: from description to measurement. *Anesthesiology*, 103(1), 199-202.
- Melzack, R., et Wall, P. D. (1965). Pain mechanisms: a new theory. *Science*, 150(3699), 971-979.
- Meyer, L., Venard, C., Schaeffer, V., Patte-Mensah, C., et Mensah-Nyagan, A. G. (2008). The biological activity of 3alpha-hydroxysteroid oxido-reductase in the spinal cord regulates thermal and mechanical pain thresholds after sciatic nerve injury. *Neurobiol Dis*, 30(1), 30-41.
- Micevych, P., et Sinchak, K. (2001). Estrogen and endogenous opioids regulate CCK in reproductive circuits. *Peptides*, 22(8), 1235-1244.
- Micevych, P. E., Rissman, E. F., Gustafsson, J.-A., et Sinchak, K. (2003). Estrogen receptor-alpha is required for estrogen-induced mu-opioid receptor internalization. *J Neurosci Res*, 71(6), 802-810.
- Miettunen, J., Lauronen, E., Kantojarvi, L., Veijola, J., et Joukamaa, M. (2008). Inter-correlations between Cloninger's temperament dimensions-- a meta-analysis. *Psychiatry Res*, 160(1), 106-114.
- Mihalek, R. M., Banerjee, P. K., Korpi, E. R., Quinlan, J. J., Firestone, L. L., Mi, Z. P., et al. (1999). Attenuated sensitivity to neuroactive steroids in gamma-aminobutyrate type A receptor delta subunit knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(22), 12905-12910.
- Millan, M. J. (2002). Descending control of pain. *Prog Neurobiol*, 66(6), 355-474.
- Minier, F., et Sigel, E. (2004). Techniques: Use of concatenated subunits for the study of ligand-gated ion channels. *Trends Pharmacol Sci*, 25(9), 499-503.
- Mitchell, E. A., Herd, M. B., Gunn, B. G., Lambert, J. J., et Belelli, D. (2008). Neurosteroid modulation of GABAA receptors: molecular determinants and significance in health and disease. *Neurochem Int*, 52(4-5), 588-595.
- Mitra, S. W., Hoskin, E., Yudkovitz, J., Pear, L., Wilkinson, H. A., Hayashi, S., et al. (2003). Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology*, 144(5), 2055-2067.
- Mody, I. (2005). Aspects of the homeostatic plasticity of GABAA receptor-mediated inhibition. *J Physiol*, 562(Pt 1), 37-46.
- Mogil, J. S. (2012). Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon. *Nat Rev Neurosci*, 13(12), 859-866.
- Mogil, J. S., et Cramer, S. E. (2004). What should we be measuring in behavioral studies of chronic pain in animals? *Pain*, 112(1-2), 12-15.
- Mogil, J. S., Sternberg, W. F., Kest, B., Marek, P., et Liebeskind, J. C. (1993). Sex differences in the antagonism of swim stress-induced analgesia: effects of gonadectomy and estrogen replacement. *Pain*, 53(1), 17-25.
- Mogil, J. S., Wilson, S. G., Chesler, E. J., Rankin, A. L., Nemmani, K. V., Lariviere, W. R., et al. (2003). The melanocortin-1 receptor gene mediates female-specific mechanisms of analgesia in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(8), 4867-4872.
- Mohler, H. (2007). Molecular regulation of cognitive functions and developmental plasticity: impact of GABAA receptors. *J Neurochem*, 102(1), 1-12.

- Mohler, H., Fritschy, J. M., Crestani, F., Hensch, T., et Rudolph, U. (2004). Specific GABA(A) circuits in brain development and therapy. *Biochem Pharmacol*, 68(8), 1685-1690.
- Mohrland, J. S., et Gebhart, G. F. (1980). Effect of selective destruction of serotonergic neurons in nucleus raphe magnus on morphine-induced antinociception. *Life Sci*, 27(25-26), 2627-2632.
- Molina, N., Bedran-de-Castro, M. T., et Bedran-de-Castro, J. C. (1994). Sex-related differences in the analgesic response to the rat tail immersion test. *Braz J Med Biol Res*, 27(7), 1669-1672.
- Mongini, F., Fassino, S., Rota, E., Deregibus, A., Levi, M., Monticone, D., et al. (2005). The temperament and character inventory in women with migraine. *J Headache Pain*, 6(4), 247-249.
- Monnet, F. P., Blier, P., Debonnel, G., et de Montigny, C. (1992). Modulation by sigma ligands of N-methyl-D-aspartate-induced [3H]noradrenaline release in the rat hippocampus: G-protein dependency. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 346(1), 32-39.
- Monnet, F. P., Debonnel, G., Junien, J. L., et Montigny, C. D. (1990). N-methyl-D-aspartate-induced neuronal activation is selectively modulated by sigma receptors. *Eur J Pharmacol*, 179(3), 441-445.
- Monnet, F. P., Mahe, V., Robel, P., et Baulieu, E. E. (1995). Neurosteroids, via sigma receptors, modulate the [3H]norepinephrine release evoked by N-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(9), 3774-3778.
- Monnet, F. P., et Maurice, T. (2006). The sigma1 protein as a target for the non-genomic effects of neuro(active)steroids: molecular, physiological, and behavioral aspects. *J Pharmacol Sci*, 100(2), 93-118.
- Moreau, J. L., et Fields, H. L. (1986). Evidence for GABA involvement in midbrain control of medullary neurons that modulate nociceptive transmission. *Brain Res*, 397(1), 37-46.
- Morgan, M. M., et Whitney, P. K. (1996). Behavioral analysis of diffuse noxious inhibitory controls (DNIC): antinociception and escape reactions. *Pain*, 66(2-3), 307-312.
- Morrison, M. F., Katz, I. R., Parmelee, P., Boyce, A. A., et TenHave, T. (1998). Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) and psychiatric and laboratory measures of frailty in a residential care population. *Am J Geriatr Psychiatry*, 6(4), 277-284.
- Morrow, A. L. (2007). Recent developments in the significance and therapeutic relevance of neuroactive steroids--Introduction to the special issue. *Pharmacol Ther*, 116(1), 1-6.
- Morton, C. R., Du, H. J., Xiao, H. M., Maisch, B., et Zimmermann, M. (1988). Inhibition of nociceptive responses of lumbar dorsal horn neurones by remote noxious afferent stimulation in the cat. *Pain*, 34(1), 75-83.
- Moshiree, B., Price, D. D., Robinson, M. E., Gaible, R., et Verne, G. N. (2007). Thermal and visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome patients with and without fibromyalgia. *Clin J Pain*, 23(4), 323-330.
- Moulin, D. E., Clark, A. J., Speechley, M., et Morley-Forster, P. K. (2002). Chronic pain in Canada--prevalence, treatment, impact and the role of opioid analgesia. *Pain Res Manag*, 7(4), 179-184.
- Munaro, N. I. (1978). The effect of ovarian steroids on hypothalamic 5-hydroxytryptamine neuronal activity. *Neuroendocrinology*, 26(5), 270-276.

- Murphy, A. Z., et Hoffman, G. E. (2001). Distribution of gonadal steroid receptor-containing neurons in the preoptic-periaqueductal gray-brainstem pathway: a potential circuit for the initiation of male sexual behavior. *J Comp Neurol*, 438(2), 191-212.
- Nabekura, J., Oomura, Y., Minami, T., Mizuno, Y., et Fukuda, A. (1986). Mechanism of the rapid effect of 17 beta-estradiol on medial amygdala neurons. *Science*, 233(4760), 226-228.
- Naftolin, F., Ryan, K. J., Davies, I. J., Petro, Z., et Kuhn, M. (1975). The formation and metabolism of estrogens in brain tissues. *Adv Biosci*, 15, 105-121.
- Neeck, G., et Crofford, L. J. (2000). Neuroendocrine perturbations in fibromyalgia and chronic fatigue syndrome. *Rheum Dis Clin North Am*, 26(4), 989-1002.
- Nieschlag, E., Loriaux, D. L., Ruder, H. J., Zucker, I. R., Kirschner, M. A., et Lipsett, M. B. (1973). The secretion of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulphate in man. *J Endocrinol*, 57(1), 123-134.
- Nijssen, M. J., Ongenae, N. G., Coulie, B., et Meulemans, A. L. (2003). Telemetric animal model to evaluate visceral pain in the freely moving rat. *Pain*, 105(1-2), 115-123.
- Nomura, M., Korach, K. S., Pfaff, D. W., et Ogawa, S. (2003). Estrogen receptor beta (ERbeta) protein levels in neurons depend on estrogen receptor alpha (ERalpha) gene expression and on its ligand in a brain region-specific manner. *Brain Res Mol Brain Res*, 110(1), 7-14.
- Nusser, Z., Sieghart, W., et Somogyi, P. (1998). Segregation of different GABA_A receptors to synaptic and extrasynaptic membranes of cerebellar granule cells. *J Neurosci*, 18(5), 1693-1703.
- Nyman, E. S., Loukola, A., Varilo, T., Ekelund, J., Veijola, J., Joukamaa, M., et al. (2009). Impact of the dopamine receptor gene family on temperament traits in a population-based birth cohort. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 150B(6), 854-865.
- O'Connor, P., et Chipkin, R. E. (1984). Comparisons between warm and cold water swim stress in mice. *Life Sci*, 35(6), 631-639.
- Ochsner, K. N., Ludlow, D. H., Knierim, K., Hanelin, J., Ramachandran, T., Glover, G. C., et al. (2006). Neural correlates of individual differences in pain-related fear and anxiety. *Pain*, 120(1-2), 69-77.
- Ocvirk, R., Pearson Murphy, B. E., Franklin, K. B., et Abbott, F. V. (2008). Antinociceptive profile of ring A-reduced progesterone metabolites in the formalin test. *Pain*, 138(2), 402-409.
- Offenbaecher, M., Bondy, B., de Jonge, S., Glatzeder, K., Kruger, M., Schoeps, P., et al. (1999). Possible association of fibromyalgia with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Arthritis Rheum*, 42(11), 2482-2488.
- Ogden, J., Desrichard, O., et Moatti, J. P. (2008). *Psychologie de la santé: A Textbook*: De Boeck Supérieur.
- Osterlund, M., Kuiper, G. G., Gustafsson, J. A., et Hurd, Y. L. (1998). Differential distribution and regulation of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA within the female rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 54(1), 175-180.
- Otto, M. W., et Dougher, M. J. (1985). Sex differences and personality factors in responsivity to pain. *Percept Mot Skills*, 61(2), 383-390.
- Pagé, C. (2010). *Role de la testosterone dans la perception et la modulation de la douleur chez les hommes*. Maitrise, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Qc, Canada.

- Palacios, G., Muro, A., Vela, J. M., Molina-Holgado, E., Guitart, X., Ovalle, S., *et al.* (2003). Immunohistochemical localization of the sigma1-receptor in oligodendrocytes in the rat central nervous system. *Brain Res*, 961(1), 92-99.
- Palacios, G., Muro, A., Verdu, E., Pumarola, M., *et Vela*, J. M. (2004). Immunohistochemical localization of the sigma1 receptor in Schwann cells of rat sciatic nerve. *Brain Res*, 1007(1-2), 65-70.
- Park-Chung, M., Malayev, A., Purdy, R. H., Gibbs, T. T., *et Farb*, D. H. (1999). Sulfated and unsulfated steroids modulate gamma-aminobutyric acidA receptor function through distinct sites. *Brain Res*, 830(1), 72-87.
- Park-Chung, M., Wu, F. S., *et Farb*, D. H. (1994). 3 alpha-Hydroxy-5 beta-pregnan-20-one sulfate: a negative modulator of the NMDA-induced current in cultured neurons. *Mol Pharmacol*, 46(1), 146-150.
- Pathirathna, S., Brimelow, B. C., Jagodic, M. M., Krishnan, K., Jiang, X., Zorumski, C. F., *et al.* (2005a). New evidence that both T-type calcium channels and GABAA channels are responsible for the potent peripheral analgesic effects of 5alpha-reduced neuroactive steroids. *Pain*, 114(3), 429-443.
- Pathirathna, S., Todorovic, S. M., Covey, D. F., *et Jevtovic-Todorovic*, V. (2005b). 5alpha-reduced neuroactive steroids alleviate thermal and mechanical hyperalgesia in rats with neuropathic pain. *Pain*, 117(3), 326-339.
- Patte-Mensah, C., Kibaly, C., Boudard, D., Schaeffer, V., Begle, A., Saredi, S., *et al.* (2006). Neurogenic pain and steroid synthesis in the spinal cord. *J Mol Neurosci*, 28(1), 17-31.
- Pavlin, D. J., Sullivan, M. J., Freund, P. R., *et Roesen*, K. (2005). Catastrophizing: a risk factor for postsurgical pain. *Clin J Pain*, 21(1), 83-90.
- Pednekar, J. R., *et Mulgaonker*, V. K. (1995). Role of testosterone on pain threshold in rats. *Indian J Physiol Pharmacol*, 39(4), 423-424.
- Pelissolo, A., *et Corruble*, E. (2002). [Personality factors in depressive disorders: contribution of the psychobiologic model developed by Cloninger]. *Encephale*, 28(4), 363-373.
- Peng, Y. B., Lin, Q., *et Willis*, W. D. (1996a). Effects of GABA and glycine receptor antagonists on the activity and PAG-induced inhibition of rat dorsal horn neurons. *Brain Res*, 736(1-2), 189-201.
- Peng, Y. B., Lin, Q., *et Willis*, W. D. (1996b). Involvement of alpha-2 adrenoceptors in the periaqueductal gray-induced inhibition of dorsal horn cell activity in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 278(1), 125-135.
- Peng, Y. B., Lin, Q., *et Willis*, W. D. (1996c). The role of 5-HT3 receptors in periaqueductal gray-induced inhibition of nociceptive dorsal horn neurons in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 276(1), 116-124.
- Peters, A., *et McEwen*, B. S. (2012). Introduction for the allostatic load special issue. *Physiol Behav*, 106(1), 1-4.
- Peters, J. A., Kirkness, E. F., Callachan, H., Lambert, J. J., *et Turner*, A. J. (1988). Modulation of the GABAA receptor by depressant barbiturates and pregnane steroids. *Br J Pharmacol*, 94(4), 1257-1269.
- Pfaff, D., *et Keiner*, M. (1973). Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *J Comp Neurol*, 151 (2), 121-158.

- Phan, V. L., Urani, A., Sandillon, F., Privat, A., et Maurice, T. (2003). Preserved sigma1 (sigma1) receptor expression and behavioral efficacy in the aged C57BL/6 mouse. *Neurobiol Aging*, 24(6), 865-881.
- Pielsticker, A., Haag, G., Zaudig, M., et Lautenbacher, S. (2005). Impairment of pain inhibition in chronic tension-type headache. *Pain*, 118(1-2), 215-223.
- Pietras, R. J., et Szego, C. M. (1977). Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature*, 265(5589), 69-72.
- Pillemer, S. R., Bradley, L. A., Crofford, L. J., Moldofsky, H., et Chrousos, G. P. (1997). The neuroscience and endocrinology of fibromyalgia. *Arthritis Rheum*, 40(11), 1928-1939.
- Pinto-Ribeiro, F., Moreira, V., Pego, J. M., Leao, P., Almeida, A., et Sousa, N. (2009). Antinociception induced by chronic glucocorticoid treatment is correlated to local modulation of spinal neurotransmitter content. *Mol Pain*, 5, 41.
- Poisbeau, P., Patte-Mensah, C., Keller, A. F., Barrot, M., Breton, J. D., Luis-Delgado, O. E., et al. (2005). Inflammatory pain upregulates spinal inhibition via endogenous neurosteroid production. *J Neurosci*, 25(50), 11768-11776.
- Popescu, A., LeResche, L., Truelove, E. L., et Drangsholt, M. T. (2010). Gender differences in pain modulation by diffuse noxious inhibitory controls: a systematic review. *Pain*, 150(2), 309-318.
- Powell-Boone, T., Ness, T. J., Cannon, R., Lloyd, L. K., Weigent, D. A., et Fillingim, R. B. (2005). Menstrual cycle affects bladder pain sensation in subjects with interstitial cystitis. *J Urol*, 174(5), 1832-1836.
- Price, T. J., Cervero, F., Gold, M. S., Hammond, D. L., et Prescott, S. A. (2009). Chloride regulation in the pain pathway. *Brain Res Rev*, 60(1), 149-170
- Proudfit, H. K. (1981). Time-course of alterations in morphine-induced analgesia and nociceptive threshold following medullary raphe lesions. *Neuroscience*, 6(5), 945-951.
- Proudfit, H. K., et Anderson, E. G. (1975). Morphine analgesia: blockade by raphe magnus lesions. *Brain Res*, 98(3), 612-618.
- Pud, D., Eisenberg, E., Sprecher, E., Rogowski, Z., et Yarnitsky, D. (2004). The tridimensional personality theory and pain: harm avoidance and reward dependence traits correlate with pain perception in healthy volunteers. *Eur J Pain*, 8(1), 31-38.
- Pud, D., Sprecher, E., et Yarnitsky, D. (2005). Homotopic and heterotopic effects of endogenous analgesia in healthy volunteers. *Neurosci Lett*, 380(3), 209-213.
- Pud, D., Yarnitsky, D., Sprecher, E., Rogowski, Z., Adler, R., et Eisenberg, E. (2006). Can personality traits and gender predict the response to morphine? An experimental cold pain study. *Eur J Pain*, 10(2), 103-112.
- Purdy, R. H., Morrow, A. L., Moore, P. H., Jr., et Paul, S. M. (1991). Stress-induced elevations of gamma-aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(10), 4553-4557.
- Raboisson, P., Dallel, R., Bernard, J. F., Le Bars, D., et Villanueva, L. (1996). Organization of efferent projections from the spinal cervical enlargement to the medullary subnucleus reticularis dorsalis and the adjacent cuneate nucleus: a PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol*, 367(4), 503-517.
- Racine, M., Tousignant-Laflamme, Y., Kloda, L. A., Dion, D., Dupuis, G., et Choiniere, M. (2012a). A systematic literature review of 10years of research on sex/gender and

- experimental pain perception - Part 1: Are there really differences between women and men? *Pain*, 153(3), 602-618.
- Racine, M., Tousignant-Laflamme, Y., Kloda, L. A., Dion, D., Dupuis, G., et Choiniere, M. (2012b). A systematic literature review of 10years of research on sex/gender and pain perception - Part 2: Do biopsychosocial factors alter pain sensitivity differently in women and men? *Pain*, 153(3), 619-635.
- Rainville, P., Carrier, B., Hofbauer, R. K., Bushnell, M. C., et Duncan, G. H. (1999). Dissociation of sensory and affective dimensions of pain using hypnotic modulation. *Pain*, 82(2), 159-171.
- Ramaekers, D., Ector, H., Aubert, A. E., Rubens, A., et Van de Werf, F. (1998). Heart rate variability and heart rate in healthy volunteers. Is the female autonomic nervous system cardioprotective? *Eur Heart J*, 19(9), 1334-1341.
- Ramirez-Maestre, C., Lopez Martinez, A. E., et Zarazaga, R. E. (2004). Personality characteristics as differential variables of the pain experience. *J Behav Med*, 27(2), 147-165.
- Raz, L., Khan, M. M., Mahesh, V. B., Vadlamudi, R. K., et Brann, D. W. (2008). Rapid estrogen signaling in the brain. *Neurosignals*, 16(2-3), 140-153.
- Rey, R. (2011). *Histoire de la douleur*. Paris: La Decouverte.
- Reynolds, D. V. (1969). Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science*, 164(3878), 444-445.
- Rhodes, M. E., Li, P. K., Flood, J. F., et Johnson, D. A. (1996). Enhancement of hippocampal acetylcholine release by the neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate: an in vivo microdialysis study. *Brain Res*, 733(2), 284-286.
- Rhudy, J. L., et Meagher, M. W. (2000). Fear and anxiety: divergent effects on human pain thresholds. *Pain*, 84(1), 65-75.
- Riedel, W., Layka, H., et Neeck, G. (1998). Secretory pattern of GH, TSH, thyroid hormones, ACTH, cortisol, FSH, and LH in patients with fibromyalgia syndrome following systemic injection of the relevant hypothalamic-releasing hormones. *Z Rheumatol*, 57 Suppl 2, 81-87.
- Riley, J. L., Robinson, M. E., Wise, E. A., et Price, D. D. (1999). A meta-analytic review of pain perception across the menstrual cycle. *Pain*, 81(3), 225-235.
- Robichaud, P. (2009). *Implication des hormones sexuelles et des cellules gliales dans un modèle animal de douleur neuropathique*. Maitrise Mémoire, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Qc, Canada. (939540-1001)
- Robinson, M. E., Riley, J. L., 3rd, Myers, C. D., Papas, R. K., Wise, E. A., Waxenberg, L. B., et al. (2001). Gender role expectations of pain: relationship to sex differences in pain. *J Pain*, 2(5), 251-257.
- Roglio, I., Bianchi, R., Giatti, S., Cavaletti, G., Caruso, D., Scurati, S., et al. (2007). Testosterone derivatives are neuroprotective agents in experimental diabetic neuropathy. *Cell Mol Life Sci*, 64(9), 1158-1168.
- Roglio, I., Bianchi, R., Gotti, S., Scurati, S., Giatti, S., Pesaresi, M., et al. (2008). Neuroprotective effects of dihydroprogesterone and progesterone in an experimental model of nerve crush injury. *Neuroscience*, 155(3), 673-685.
- Roh, D. H., Kim, H. W., Yoon, S. Y., Seo, H. S., Kwon, Y. B., Kim, K. W., et al. (2008). Intrathecal administration of sigma-1 receptor agonists facilitates nociception: involvement of a protein kinase C-dependent pathway. *J Neurosci Res*, 86(16), 3644-3654.

- Romero, M. T., Cooper, M. L., Komisaruk, B. R., et Bodnar, R. J. (1988). Gender-specific and gonadectomy-specific effects upon swim analgesia: role of steroid replacement therapy. *Physiol Behav*, 44(2), 257-265.
- Romero, M. T., Kepler, K. L., Cooper, M. L., Komisaruk, B. R., et Bodnar, R. J. (1987). Modulation of gender-specific effects upon swim analgesia in gonadectomized rats. *Physiol Behav*, 40(1), 39-45.
- Ronnekleiv, O. K., et Kelly, M. J. (2005). Diversity of ovarian steroid signaling in the hypothalamus. *Front Neuroendocrinol*, 26(2), 65-84.
- Rosenbaum, M. (1980a). Individual differences in self-control behaviors and tolerance of painful stimulation. *J Abnorm Psychol*, 89(4), 581-590.
- Rosenbaum, M. (1980b). A schedule for assessing self-control behaviors: preliminary findings. *Behavior Therapy*, 11, 109-121.
- Rosenstiel, A. K., et Keefe, F. J. (1983). The use of coping strategies in chronic low back pain patients: relationship to patient characteristics and current adjustment. *Pain*, 17(1), 33-44.
- Rosier, E. M., Iadarola, M. J., et Coghill, R. C. (2002). Reproducibility of pain measurement and pain perception. *Pain*, 98(1-2), 205-216.
- Rupprecht, R. (1997). The neuropsychopharmacological potential of neuroactive steroids. *J Psychiatr Res*, 31(3), 297-314.
- Rupprecht, R. (2003). Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. *Psychoneuroendocrinology*, 28(2), 139-168.
- Rupprecht, R., et Holsboer, F. (1999). Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci*, 22(9), 410-416.
- Russell, I. J. (1996). Fibromyalgia syndrome: approaches to management. *Bull Rheum Dis*, 45(3), 1-4.
- Ryan, S. M., et Maier, S. F. (1988). The estrous cycle and estrogen modulate stress-induced analgesia. *Behav Neurosci*, 102(3), 371-380.
- Saleem, S., Hussain, M. M., Majeed, S. M., et Khan, M. A. (2012). Gender differences of heart rate variability in healthy volunteers. *J Pak Med Assoc*, 62(5), 422-425.
- Sanchez-Roman, S., Tellez-Zenteno, J. F., Zermeno-Phols, F., Garcia-Ramos, G., Velazquez, A., Derry, P., et al. (2007). Personality in patients with migraine evaluated with the "Temperament and Character Inventory". *J Headache Pain*, 8(2), 94-104.
- Sanoja, R., et Cervero, F. (2005). Estrogen-dependent abdominal hyperalgesia induced by ovariectomy in adult mice: a model of functional abdominal pain. *Pain*, 118(1-2), 243-253.
- Sanoja, R., et Cervero, F. (2008). Estrogen modulation of ovariectomy-induced hyperalgesia in adult mice. *Eur J Pain*, 12(5), 573-581.
- Sanoja, R., et Cervero, F. (2010). Estrogen-dependent changes in visceral afferent sensitivity. *Auton Neurosci*, 153(1-2), 84-89.
- Sarzi-Puttini, P., Atzeni, F., Diana, A., Doria, A., et Furlan, R. (2006). Increased neural sympathetic activation in fibromyalgia syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, 1069, 109-117.
- Sawynok, J., et Liu, X. J. (2003). The Formalin Test: Characteristics and Usefulness of the Model. *Reviews in Analgesia*, 7(2), 145-163.

- Saxena, N. C., et Macdonald, R. L. (1994). Assembly of GABAA receptor subunits: role of the delta subunit. *J Neurosci*, *14*(11 Pt 2), 7077-7086.
- Schell, E., Theorell, T., Hasson, D., Arnetz, B., et Saraste, H. (2008). Stress biomarkers' associations to pain in the neck, shoulder and back in healthy media workers: 12-month prospective follow-up. *Eur Spine J*, *17*(3), 393-405.
- Schieir, O., Thombs, B. D., Hudson, M., Taillefer, S., Steele, R., Berkson, L., et al. (2009). Symptoms of depression predict the trajectory of pain among patients with early inflammatory arthritis: a path analysis approach to assessing change. *J Rheumatol*, *36*(2), 231-239.
- Schlichter, R., Keller, A. F., De Roo, M., Breton, J. D., Inquimbert, P., et Poisbeau, P. (2006). Fast nongenomic effects of steroids on synaptic transmission and role of endogenous neurosteroids in spinal pain pathways. *J Mol Neurosci*, *28*(1), 33-51.
- Selye, H. (1941a). Acquired adaptation to the anesthetic effect of steroid hormones. *J Immunol.*, *41*, 259-268.
- Selye, H. (1941b). Anesthetic effect of steroid hormone. *Proc. Soc. Exper. Biol & Med.*, *46*, 116-121.
- Selye, H. (1941c). On the Hormonal Activity of a Steroid Compound. *Science*, *94*(2430), 94.
- Semyanov, A., Walker, M. C., Kullmann, D. M., et Silver, R. A. (2004). Tonicly active GABA A receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci*, *27*(5), 262-269.
- Senba, E., Imbe, H., et Okamoto, K. (2008). [Descending facilitation in chronic stress and chronic pain state]. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*, *28*(1), 29-35.
- Senna, E. R., De Barros, A. L., Silva, E. O., Costa, I. F., Pereira, L. V., Ciconelli, R. M., et al. (2004). Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. *J Rheumatol*, *31*(3), 594-597.
- Serpell, M. G., Makin, A., et Harvey, A. (1998). Acute pain physiology and pharmacological targets: The present and future. *Acute Pain*, *1*, 31-47.
- Serretti, A., Mandelli, L., Lorenzi, C., Landoni, S., Calati, R., Insacco, C., et al. (2006). Temperament and character in mood disorders: influence of DRD4, SERTPR, TPH and MAO-A polymorphisms. *Neuropsychobiology*, *53*(1), 9-16.
- Shah, Y., et Dostrovsky, J. O. (1980). Electrophysiological evidence for a projection of the periaqueductal gray matter to nucleus raphe magnus in cat and rat. *Brain Res*, *193*(2), 534-538.
- Sheehan, J., McKay, J., Ryan, M., Walsh, N., et O'Keeffe, D. (1996). What cost chronic pain? . *Irish Medical Journal*, *89*(6), 218-219.
- Shu, H.-J., Eisenman, L. N., Jinadasa, D., Covey, D. F., Zorumski, C. F., et Mennerick, S. (2004). Slow actions of neuroactive steroids at GABAA receptors. *J Neurosci*, *24*(30), 6667-6675.
- Shughrue, P. J., Bushnell, C. D., et Dorsa, D. M. (1992). Estrogen receptor messenger ribonucleic acid in female rat brain during the estrous cycle: a comparison with ovariectomized females and intact males. *Endocrinology*, *131*(1), 381-388.
- Sieghart, W. (2006). Structure, pharmacology, and function of GABAA receptor subtypes. *Adv Pharmacol*, *54*, 231-263.
- Simerly, R. B., Chang, C., Muramatsu, M., et Swanson, L. W. (1990). Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol*, *294*(1), 76-95.

- Sinchak, K., et Micevych, P. E. (2001). Progesterone blockade of estrogen activation of mu-opioid receptors regulates reproductive behavior. *J Neurosci*, 21(15), 5723-5729.
- Smith, K. A., Ploghaus, A., Cowen, P. J., McCleery, J. M., Goodwin, G. M., Smith, S., et al. (2002). Cerebellar responses during anticipation of noxious stimuli in subjects recovered from depression. Functional magnetic resonance imaging study. *Br J Psychiatry*, 181, 411-415.
- Smith, S. S., Shen, H., Gong, Q. H., et Zhou, X. (2007). Neurosteroid regulation of GABA(A) receptors: Focus on the alpha4 and delta subunits. *Pharmacol Ther*, 116 %6(1), 58-76 %&.
- Smith, S. S., Waterhouse, B. D., et Woodward, D. J. (1987). Sex steroid effects on extrahypothalamic CNS. II. Progesterone, alone and in combination with estrogen, modulates cerebellar responses to amino acid neurotransmitters. *Brain Res*, 422(1), 52-62.
- Smith, Y. R., Stohler, C. S., Nichols, T. E., Bueller, J. A., Koeppe, R. A., et Zubieta, J.-K. (2006). Pronociceptive and antinociceptive effects of estradiol through endogenous opioid neurotransmission in women. *J Neurosci*, 26(21), 5777-5785.
- Song, M., et Messing, R. O. (2005). Protein kinase C regulation of GABAA receptors. *Cell Mol Life Sci*, 62(2), 119-127.
- Soriani, O., Foll, F. L., Roman, F., Monnet, F. P., Vaudry, H., et Cazin, L. (1999). A-Current down-modulated by sigma receptor in frog pituitary melanotrope cells through a G protein-dependent pathway. *J Pharmacol Exp Ther*, 289(1), 321-328.
- Soriani, O., Vaudry, H., Mei, Y. A., Roman, F., et Cazin, L. (1998). Sigma ligands stimulate the electrical activity of frog pituitary melanotrope cells through a G-protein-dependent inhibition of potassium conductances. *J Pharmacol Exp Ther*, 286(1), 163-171.
- Spiaggia, A., Bodnar, R. J., Kelly, D. D., et Glusman, M. (1979). Opiate and non-opiate mechanisms of stress-induced analgesia: cross-tolerance between stressors. *Pharmacol Biochem Behav*, 10(5), 761-765.
- Spielberger, C. D., et Vagg, P. R. (1984). Psychometric properties of the STAI: a reply to Ramanaiah, Franzen, and Schill. *J Pers Assess*, 48(1), 95-97.
- Spooner, M. F., Robichaud, P., Carrier, J. C., et Marchand, S. (2007). Endogenous pain modulation during the formalin test in estrogen receptor beta knockout mice. *Neuroscience*, 150(3), 675-680.
- Steenbergen, H. L., Heinsbroek, R. P., Van Hest, A., et Van de Poll, N. E. (1990). Sex-dependent effects of inescapable shock administration on shuttlebox-escape performance and elevated plus-maze behavior. *Physiol Behav*, 48(4), 571-576.
- Stell, B. M., Brickley, S. G., Tang, C. Y., Farrant, M., et Mody, I. (2003). Neuroactive steroids reduce neuronal excitability by selectively enhancing tonic inhibition mediated by delta subunit-containing GABAA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(24), 14439-14444.
- Stell, B. M., et Mody, I. (2002). Receptors with different affinities mediate phasic and tonic GABA(A) conductances in hippocampal neurons. *J Neurosci*, 22(10), RC223.
- Sterling, P., et Eyer, J. (1988). *Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology*.
- Sternberg, W. F., Mogil, J. S., Kest, B., Page, G. G., Leong, Y., Yam, V., et al. (1995). Neonatal testosterone exposure influences neurochemistry of non-opioid swim stress-induced analgesia in adult mice. *Pain*, 63(3), 321-326.

- Stiller, C. O., Linderoth, B., O'Connor, W. T., Franck, J., Falkenberg, T., Ungerstedt, U., *et al.* (1995). Repeated spinal cord stimulation decreases the extracellular level of gamma-aminobutyric acid in the periaqueductal gray matter of freely moving rats. *Brain Res*, 699(2), 231-241.
- Straub, R. H., et Cutolo, M. (2001). Involvement of the hypothalamic--pituitary--adrenal/gonadal axis and the peripheral nervous system in rheumatoid arthritis: viewpoint based on a systemic pathogenetic role. *Arthritis Rheum*, 44(3), 493-507.
- Strigo, I. A., Simmons, A. N., Matthews, S. C., Craig, A. D. B., et Paulus, M. P. (2008). Increased affective bias revealed using experimental graded heat stimuli in young depressed adults: evidence of "emotional allodynia". *Psychosom Med*, 70(3), 338-344.
- Su, T. P., London, E. D., et Jaffe, J. H. (1988). Steroid binding at sigma receptors suggests a link between endocrine, nervous, and immune systems. *Science*, 240(4849), 219-221.
- Sullivan, M. J., Adams, H., Martel, M. O., Scott, W., et Wideman, T. (2011). Catastrophizing and perceived injustice: risk factors for the transition to chronicity after whiplash injury. *Spine (Phila Pa 1976)*, 36(25 Suppl), S244-249.
- Sullivan, M. J. L. a. B., S.R. and Pivik, J. (1995). The Pain Catastrophizing Scale: Development and validation. *Psychol Assess*, 7, 524-532.
- Sumner, B. E., et Fink, G. (1997). The density of 5-hydroxytryptamine_{2A} receptors in forebrain is increased at pro-oestrus in intact female rats. *Neurosci Lett*, 234(1), 7-10.
- Sumner, B. E., et Fink, G. (1998). Testosterone as well as estrogen increases serotonin_{2A} receptor mRNA and binding site densities in the male rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 59(2), 205-214.
- Tall, J. M., et Crisp, T. (2004). Effects of gender and gonadal hormones on nociceptive responses to intraplantar carrageenan in the rat. *Neurosci Lett*, 354(3), 239-241.
- Thorn, B. E., Clements, K. L., Ward, L. C., Dixon, K. E., Kersh, B. C., Boothby, J. L., *et al.* (2004). Personality factors in the explanation of sex differences in pain catastrophizing and response to experimental pain. *Clin J Pain*, 20(5), 275-282.
- Tjolsen, A., Rosland, J. H., Berge, O. G., et Hole, K. (1991). The increasing-temperature hot-plate test: an improved test of nociception in mice and rats. *J Pharmacol Methods*, 25(3), 241-250.
- Tomer, R., et Aharon-Peretz, J. (2004). Novelty seeking and harm avoidance in Parkinson's disease: effects of asymmetric dopamine deficiency. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 75(7), 972-975.
- Tousignant-Laflamme, Y., Goffaux, P., Bourgault, P., et Marchand, S. (2006). Different autonomic responses to experimental pain in IBS patients and healthy controls. *J Clin Gastroenterol*, 40(9), 814-820.
- Tousignant-Laflamme, Y., et Marchand, S. (2009). Excitatory and inhibitory pain mechanisms during the menstrual cycle in healthy women. *Pain*, 146(1-2), 47-55.
- Tousignant-Laflamme, Y., et Marchand, S. (2012). Aging independently of the hormonal status changes pain responses in young postmenopausal women. *Pain Res Treat*, 2012, 693912.
- Tousignant-Laflamme, Y., Page, S., Goffaux, P., et Marchand, S. (2008). An experimental model to measure excitatory and inhibitory pain mechanisms in humans. *Brain Res*, 1230, 73-79.

- Tousignant-Laflamme, Y., Rainville, P., et Marchand, S. (2005). Establishing a link between heart rate and pain in healthy subjects: a gender effect. *J Pain*, 6(6), 341-347.
- Treede, R. D., Meyer, R. A., et Campbell, J. N. (1998). Myelinated mechanically insensitive afferents from monkey hairy skin: heat-response properties. *J Neurophysiol*, 80(3), 1082-1093.
- Trudel, M., Mercier, H., et J., M. (2001). Caractéristiques psychométriques de la version française de l'Inventaire du Tempérament et du Caractère. *Psychologie et Psychométrie*, 22(3-4), 5-27.
- Tyrka, A. R., Mello, A. F., Mello, M. F., Gagne, G. G., Grover, K. E., Anderson, G. M., et al. (2006). Temperament and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in healthy adults. *Psychoneuroendocrinology*, 31(9), 1036-1045.
- Uchida, H., Mizuno, K., Yoshida, A., et Ueda, H. (2003). Neurosteroid-induced hyperalgesia through a histamine release is inhibited by progesterone and p,p'-DDE, an endocrine disrupting chemical. *Neurochem Int*, 42(5), 401-407.
- Urban, M. O., et Gebhart, G. F. (1997). Characterization of biphasic modulation of spinal nociceptive transmission by neurotensin in the rat rostral ventromedial medulla. *J Neurophysiol*, 78(3), 1550-1562.
- Vaccarino, A. L., Marek, P., Sternberg, W., et Liebeskind, J. C. (1992). NMDA receptor antagonist MK-801 blocks non-opioid stress-induced analgesia in the formalin test. *Pain*, 50(1), 119-123.
- Van Bockstaele, E. J., Aston-Jones, G., Pieribone, V. A., Ennis, M., et Shipley, M. T. (1991). Subregions of the periaqueductal gray topographically innervate the rostral ventral medulla in the rat. *J Comp Neurol*, 309(3), 305-327.
- Van Houdenhove, B., et Luyten, P. (2006). Stress, depression and fibromyalgia. *Acta Neurol Belg*, 106(4), 149-156.
- Veiga, S., Leonelli, E., Beelke, M., Garcia-Segura, L. M., et Melcangi, R. C. (2006). Neuroactive steroids prevent peripheral myelin alterations induced by diabetes. *Neurosci Lett*, 402(1-2), 150-153.
- Vergnano, A. M., Schlichter, R., et Poisbeau, P. (2007). PKC activation sets an upper limit to the functional plasticity of GABAergic transmission induced by endogenous neurosteroids. *Eur J Neurosci*, 26(5), 1173-1182.
- Villanueva, L., Bernard, J. F., et Le Bars, D. (1995). Distribution of spinal cord projections from the medullary subnucleus reticularis dorsalis and the adjacent cuneate nucleus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J Comp Neurol*, 352(1), 11-32.
- Villanueva, L., Bouhassira, D., et Le Bars, D. (1996). The medullary subnucleus reticularis dorsalis (SRD) as a key link in both the transmission and modulation of pain signals. *Pain*, 67(2-3), 231-240.
- Villanueva, L., Chitour, D., et Le Bars, D. (1986). Involvement of the dorsolateral funiculus in the descending spinal projections responsible for diffuse noxious inhibitory controls in the rat. *J Neurophysiol*, 56(4), 1185-1195.
- Villanueva, L., Desbois, C., Le Bars, D., et Bernard, J. F. (1998). Organization of diencephalic projections from the medullary subnucleus reticularis dorsalis and the adjacent cuneate nucleus: a retrograde and anterograde tracer study in the rat. *J Comp Neurol*, 390(1), 133-160.
- Villanueva, L., et Le Bars, D. (1995). The activation of bulbo-spinal controls by peripheral nociceptive inputs: diffuse noxious inhibitory controls. *Biol Res*, 28(1), 113-125.

- Vining, R. F., McGinley, R. A., Maksvytis, J. J., et Ho, K. Y. (1983). Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol. *Ann Clin Biochem*, 20 (Pt 6), 329-335.
- Walker, J. M., Bowen, W. D., Walker, F. O., Matsumoto, R. R., De Costa, B., et Rice, K. C. (1990). Sigma receptors: biology and function. *Pharmacol Rev*, 42(4), 355-402.
- Wall, P. P. D., McMahon, S. S. B., et Koltzenburg, M. (2006). *Wall and Melzack's Textbook of Pain*: Elsevier Science Health Science Division.
- Wang, M., He, Y., Eisenman, L. N., Fields, C., Zeng, C.-M., Mathews, J., et al. (2002). 3beta -hydroxypregnane steroids are pregnenolone sulfate-like GABA(A) receptor antagonists. *J Neurosci*, 22 (9), 3366-3375.
- Watkins, L. R., Johannessen, J. N., Kinscheck, I. B., et Mayer, D. J. (1984). The neurochemical basis of footshock analgesia: the role of spinal cord serotonin and norepinephrine. *Brain Res*, 290(1), 107-117.
- Wehling, M. (1997). Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol*, 59, 365-393.
- Wei, W., Zhang, N., Peng, Z., Houser, C. R., et Mody, I. (2003). Perisynaptic localization of delta subunit-containing GABA(A) receptors and their activation by GABA spillover in the mouse dentate gyrus. *J Neurosci*, 23(33), 10650-10661.
- Wetzel, C. H., Hermann, B., Behl, C., Pestel, E., Rammes, G., Zieglerberger, W., et al. (1998). Functional antagonism of gonadal steroids at the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor. *Mol Endocrinol*, 12(9), 1441-1451.
- Willis, W. D., et Coggeshall, R. E. (1991). *Sensory mechanisms of the spinal cord* (Vol. 2nd %6). New York: Plenum Press.
- Wilson, S. G., et Mogil, J. S. (2001). Measuring pain in the (knockout) mouse: big challenges in a small mammal. *Behav Brain Res*, 125(1-2), 65-73.
- Winfree, C. J., Coombs, D. W., DeLeo, J. A., et Colburn, R. W. (1992). Analgesic effects of intrathecally-administered 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one in a rat mechanical visceral pain model. *Life Sci*, 50(14), 1007-1012.
- Wohlfarth, K. M., Bianchi, M. T., et Macdonald, R. L. (2002). Enhanced neurosteroid potentiation of ternary GABA(A) receptors containing the delta subunit. *J Neurosci*, 22(5), 1541-1549.
- Wolf, O. T., Köster, B., Kirschbaum, C., Pietrowsky, R., Kern, W., Hellhammer, D. H., et al. (1997). A single administration of dehydroepiandrosterone does not enhance memory performance in young healthy adults, but immediately reduces cortisol levels. *Biol Psychiatry*, 42(9), 845-848.
- Wolfe, F. (2010). New American College of Rheumatology criteria for fibromyalgia: a twenty-year journey. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 62(5), 583-584.
- Wolfe, F., Clauw, D. J., Fitzcharles, M. A., Goldenberg, D. L., Katz, R. S., Mease, P., et al. (2010). The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 62(5), 600-610.
- Wolfe, F., Smythe, H. A., Yunus, M. B., Bennett, R. M., Bombardier, C., Goldenberg, D. L., et al. (1990). The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis Rheum*, 33(2), 160-172.
- Woolley, C. S., et Schwartzkroin, P. A. (1998). Hormonal effects on the brain. *Epilepsia*, 39 Suppl 8, S2-8.

- Yaksh, T. L., et Kerr, F. W. L. (1986). *Spinal afferent processing*. New York: Plenum Press.
- Yaksh, T. L., et Rudy, T. A. (1978). Narcotic analgesics: CNS sites and mechanisms of action as revealed by intracerebral injection techniques. *Pain*, 4(4), 299-359.
- Yalcin, I., Charlet, A., Freund-Mercier, M.-J., Barrot, M., et Poisbeau, P. (2009a). Differentiating thermal allodynia and hyperalgesia using dynamic hot and cold plate in rodents. *J Pain*, 10(7), 767-773.
- Yalcin, I., Charlet, A., Freund-Mercier, M. J., Barrot, M., et Poisbeau, P. (2009b). Differentiating thermal allodynia and hyperalgesia using dynamic hot and cold plate in rodents. *J Pain*, 10(7), 767-773.
- Yarnitsky, D., Arendt-Nielsen, L., Bouhassira, D., Edwards, R. R., Fillingim, R. B., Granot, M., et al. (2010). Recommendations on terminology and practice of psychophysical DNIC testing. *Eur J Pain*, 14(4), 339.
- Yergeau, E., et Poirier, M. (2013, 21/03/2013). Régression multiple. *SPSS à L'UdeS* Retrieved 25/03/2013, 2012, from <http://pages.usherbrooke.ca/spss/pages/stat-inferentielles/regression-multiple.php>
- Yeziarski, R. P., Bowker, R. M., Kevetter, G. A., Westlund, K. N., Coulter, J. D., et Willis, W. D. (1982a). Serotonergic projections to the caudal brain stem: a double label study using horseradish peroxidase and serotonin immunocytochemistry. *Brain Res*, 239(1), 258-264.
- Yeziarski, R. P., Wilcox, T. K., et Willis, W. D. (1982b). The effects of serotonin antagonists on the inhibition of primate spinothalamic tract cells produced by stimulation in nucleus raphe magnus or periaqueductal gray. *J Pharmacol Exp Ther*, 220(2), 266-277.
- Yoon, S. Y., Roh, D. H., Seo, H. S., Kang, S. Y., Han, H. J., Beitz, A. J., et al. (2009). Intrathecal injection of the neurosteroid, DHEAS, produces mechanical allodynia in mice: involvement of spinal sigma-1 and GABA receptors. *Br J Pharmacol*, 157(4), 666-673.
- Yuri, K., et Kawata, M. (1991). The effect of estrogen on the estrogen receptor-immunoreactive cells in the rat medial preoptic nucleus. *Brain Res*, 548(1-2), 50-54.
- Zamponi, G. W., Lewis, R. J., Todorovic, S. M., Arneric, S. P., et Snutch, T. P. (2009). Role of voltage-gated calcium channels in ascending pain pathways. *Brain Res Rev*, 60(1), 84-89.
- Zhu, W. J., et Vicini, S. (1997). Neurosteroid prolongs GABAA channel deactivation by altering kinetics of desensitized states. *J Neurosci*, 17(11), 4022-4031.
- Zhuo, M., et Gebhart, G. F. (1990). Characterization of descending inhibition and facilitation from the nuclei reticularis gigantocellularis and gigantocellularis pars alpha in the rat. *Pain*, 42(3), 337-350.
- Zhuo, M., et Gebhart, G. F. (1992). Characterization of descending facilitation and inhibition of spinal nociceptive transmission from the nuclei reticularis gigantocellularis and gigantocellularis pars alpha in the rat. *J Neurophysiol*, 67 (6), 1599-1614.
- Zhuo, M., et Gebhart, G. F. (1997). Biphasic modulation of spinal nociceptive transmission from the medullary raphe nuclei in the rat. *J Neurophysiol*, 78(2), 746-758.
- Zinder, O., et Dar, D. E. (1999). Neuroactive steroids: their mechanism of action and their function in the stress response. *Acta Physiol Scand*, 167(3), 181-188.

ANNEXE 1: COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS

ARTICLES SOUMIS À DES JOURNAUX AVEC COMITÉ DE LECTURE:

- 1) **Coulombe MA**, Marchand S, Poisbeau P. *Male have a lower nociceptive threshold than female using a dynamic hot plate model: Greater involvement of gonadal hormones compared to derived metabolites*. Soumis à Brain research le 28 février 2013
- 2) **Coulombe MA**, Gaumont I, Lelièvre V, Poisbeau P, Marchand S. *The role of gonadal hormones and neurosteroids in the modulation of swim-stress induced analgesia in rats*. Soumis à Plos One le 6 juin 2013
- 3) **Coulombe MA**, Gaumont I, Lelièvre V, Poisbeau P, Marchand S. *Progesterone withdrawal effect on descending modulation of pain involves neurosteroids*. Soumis à Pain le 28 février 2013
- 4) **Coulombe MA**, Potvin S, Morin M, Marchand S. *Implication of gonadal and adrenal hormones in pain perception and clinical symptoms of fibromyalgia*. Soumis à Seminars in Arthritis and Rheumatism le 15 mai 2013.

PRÉSENTATIONS ORALES

- Coulombe MA**, Marchand S, Poisbeau P. *Implication du sexe et des hormones gonadiques dans la réponse nociceptive associée à la plaque chaude dynamique (PCD)*. 3^e Journée du centre des neurosciences de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada (2011)
- Coulombe MA**, Potvin S, Paul-Savoie E, Corbin JF, Marchand S. *La DHEA sulfate périphérique, marqueur spécifique de la douleur dans une population de sujets fibromyalgiques*. IASP Satellite symposium, Francophonie et douleur, Sherbrooke, Canada (2010)
- Coulombe MA**, Marchand S, Poisbeau P. *Implication des stéroïdes gonadiques et des neurostéroïdes dans les mécanismes d'analgésie liée au stress*. 2^e Journée du centre des neurosciences de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada (2010)

PRÉSENTATIONS PAR AFFICHE DANS DES CONGRÈS INTERNATIONAUX

- Coulombe MA**, Marchand S, Poisbeau P. *Progesterone withdrawal effect on descending modulation of pain involves neurosteroids*. **14th World Congress on Pain**, IASP, Milan, Italie (2012)
- Coulombe MA**, Marchand S, Poisbeau P. *Relationship between gonadal steroids and neurosteroids in modulation of stress-induced analgesia*. **6th International meeting : Steroid and Nervous System**, Torino, Italy (2011)
- Coulombe MA**, Potvin S, Paul-Savoie E, Corbin JF, Marchand S. *Peripheral DHEA-S levels are decreased in fibromyalgia and negatively correlated with thermal hyperalgesia*. **13th World Congress on Pain**, IASP, Montreal, Canada (2010)