

NOTE TO USERS

This reproduction is the best copy available.

UMI[®]

Université de Sherbrooke
Faculté de Médecine et des sciences de la santé

IMPLICATION DES HORMONES SEXUELLES ET DES CELLULES GLIALES
DANS UN MODÈLE ANIMAL DE DOULEUR NEUROPATHIQUE

Par
Patricia Robichaud

Sous la supervision de Serge Marchand, Ph.D. et de Julie Carrier, MD.
Faculté de médecine, service de neurochirurgie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)
Programme de physiologie et biophysique

Évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Serge Marchand, Ph.D.: Directeur de recherche

Julie Carrier, MD. : Directrice de recherche

Louis Gendron, Ph.D. : Membre du jury, interne au département

Pierre Beaulieu, MD, Ph.D. : Membre du jury, externe au département

Mars 2009
© Patricia Robichaud, 2009



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-53422-9
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-53422-9

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Sommaire

Il est maintenant bien établi que les hormones sexuelles jouent un rôle majeur dans les différences entre les sexes non seulement dans la perception de la douleur, mais également dans les processus d'inhibition de la douleur. En effet, les femmes ont des seuils de douleur moins élevés que les hommes et souffrent plus fréquemment de douleur chronique. Toutefois, le rôle des hormones sexuelles dans la douleur neuropathique a été relativement peu étudié jusqu'à présent. Des études récentes ont également démontré que les cellules gliales contribuaient à la douleur chronique, notamment à la douleur neuropathique. Dans le cadre de ce mémoire, l'implication des hormones sexuelles et des cellules gliales dans la douleur et l'analgésie a été étudiée à l'aide d'un modèle animal de douleur neuropathique.

Dans la première partie du projet, des tests comportementaux ont été réalisés afin d'observer l'implication des hormones sexuelles dans les mécanismes excitateurs et inhibiteurs de la douleur neuropathique. Suite à une constriction chronique du nerf sciatique, des souris mâles et femelles, avec ou sans leurs hormones sexuelles endogènes ont été testées pour les deux composantes majeures de ce type de douleur, soit l'allodynie et l'hyperalgésie. Les résultats obtenus vont dans le même sens que ceux obtenus précédemment dans nos laboratoires à l'aide du test à la formaline. En général, les mâles ont moins de douleur que les femelles et ce autant pour l'allodynie que l'hyperalgésie. Alors que les femelles avec et sans hormones sexuelles ont un niveau d'allodynie comparable, les mâles castrés ont pour leur part un niveau d'allodynie et d'hyperalgésie plus élevé que les mâles avec testostérone. Ces résultats démontrent bien le rôle protecteur que semble jouer la testostérone dans la douleur. De plus, comme les hormones sexuelles modulent également les mécanismes d'inhibition de la douleur, nous avons voulu vérifier leur impact sur ces mécanismes à l'aide du test de nage forcée qui déclenche une analgésie similaire aux mécanismes endogènes de contrôle de la douleur chez l'humain. Les animaux avec hormones sexuelles semblent avoir une meilleure analgésie puisque les femelles et les mâles ont moins de nociception après la nage que les femelles ovariectomisées et les mâles castrés, respectivement. Les résultats obtenus démontrent clairement que les hormones sexuelles sont bien impliquées dans les

mécanismes de modulation de la douleur neuropathique tant chez le mâle que chez la femelle.

Dans la deuxième partie du projet, l'expression d'un marqueur d'activation des cellules gliales, le « Glial Fibrillary Acidic Protein » (GFAP), a été évaluée afin de voir si l'activation des cellules gliales au niveau spinal était en corrélation avec les résultats comportementaux. L'analyse immunohistochimique a confirmé que chez les animaux ayant eu une lésion au nerf périphérique, l'activation des cellules gliales était très évidente avec une induction encore plus marquée du côté de la lésion. Ces résultats confirment l'implication des cellules gliales dans la douleur neuropathique. Chez les animaux sans douleur neuropathique, un léger marquage était observé, indiquant la présence de cellules gliales non-activées. De plus, puisque quelques études ont démontré que l'activation des cellules gliales peut être modulée par les hormones sexuelles, nous avons voulu vérifier si ce même effet pouvait être observé dans la douleur neuropathique. Cependant, tous les groupes, indépendamment de leur statut hormonal, avaient une densité spinale comparable de cellules gliales, indiquant que le statut des hormones sexuelles ne semble pas influencer l'activation des cellules gliales dans la douleur neuropathique.

Cette étude a donc permis de démontrer que les hormones sexuelles sont impliquées dans la douleur neuropathique et que les cellules gliales sont activées suite à l'insulte neuronale responsable de créer la douleur neuropathique. Par contre, la contribution des cellules gliales dans ce type de douleur ne semble pas être influencée par les hormones sexuelles. Évidemment, une meilleure caractérisation de l'implication des hormones sexuelles et des cellules gliales dans les processus douloureux permettra de mieux comprendre les bases physiologiques qui sont responsables de ces différences dans le but ultime d'orienter le traitement pharmacologique des douleurs chroniques en fonction du sexe.

Table des matières

Sommaire	2
Table des matières	4
Liste des illustrations	6
Liste des abréviations	7
Introduction	9
1. Douleur et nociception	9
2. Trajet de la douleur	10
2.1 De la stimulation à la moëlle.....	11
2.2 De la moëlle à l'intégration.....	12
3. Douleur neuropathique	13
3.1 Classification de la douleur.....	13
3.2 Généralités sur la douleur neuropathique.....	14
3.3 Caractéristiques de la douleur neuropathique.....	15
3.4 Mécanismes de la douleur neuropathique.....	17
3.4.1 Canaux sodiques.....	17
3.4.2 GABA.....	17
3.4.3 Récepteurs NMDA.....	18
3.4.4 Autres mécanismes.....	18
3.4.5 Cellules gliales.....	19
4. Cellules gliales	19
4.1 Mécanismes d'action.....	20
4.2 Cellules gliales et douleur.....	21
5. Mécanismes endogènes de modulation de la douleur	22
5.1 Mécanisme excitateurs.....	23
5.2.1 Mécanismes excitateurs spinaux.....	23
5.2.2 Mécanismes excitateurs supra-spinaux.....	23
5.2 Mécanisme inhibiteurs.....	24
5.2.1 Mécanismes inhibiteurs spinaux.....	24
5.2.2 Mécanismes inhibiteurs supra-spinaux.....	25
5.2.2.2 Contrôles inhibiteurs diffus nociceptifs (CIDN).....	25
5.2.2.3 Contrôles des centres supérieurs.....	27
6. Hormones sexuelles	27
6.1 Différences entre les sexes.....	27
6.2 Généralités sur les hormones sexuelles.....	28
6.3 Mécanismes d'action.....	29
6.4 Estrogènes.....	30
6.5 Progestérone.....	31
6.6 Androgènes.....	31
7. Implication des hormones sexuelles dans la douleur chez l'animal	32
7.1 Douleur aiguë et tonique.....	32
7.2 Douleur chronique.....	33
7.3 Douleur neuropathique.....	34
7.4 Analgésie.....	35
8. Interactions entre hormones sexuelles et cellules gliales	37
9. Modèles animaux et tests de douleur	38
9.1 Constriction chronique du nerf sciatique (Modèle de Bennett ou CCI).....	39
9.1.1 Avantages et inconvénients du modèle de Bennett.....	41
9.2 Tests de douleur expérimentale.....	41
9.2.1 Test de von Frey.....	41

9.2.2 Test de Hargreaves	42
9.2.3 Analgésie induite par la nage forcée.....	42
Objectifs de l'étude	43
Hypothèses de recherche	44
Avant-propos	45
Résumé de l'article.....	46
Article.....	47
Discussion	79
Conclusion	87
Remerciements	88
Références	89

Liste des illustrations

Figure 1 : Trajet de l'information douloureuse	10
Figure 2 : Types de fibres nerveuses	12
Figure 3 : Allodynie et hyperalgésie	16
Figure 4 : Implication des cellules gliales dans la douleur	21
Figure 5 : Théorie du portillon	24
Figure 6 : Contrôles inhibiteurs diffus nociceptifs (CIDN).....	26
Figure 7 : Les principaux modèles animaux de douleur neuropathique	39

Liste des abréviations

ANOVA	Analyse de variance
AR	Récepteurs des androgènes
CAST	Castré
CIDN	Contrôle Inhibiteur Diffus Nociceptif
CCI	Constriction chronique du nerf sciatique
ER	Récepteurs de l'estrogène
ER- α	Récepteur alpha de l'estrogène
ER- β	Récepteur bêta de l'estrogène
GABA	acide γ -aminobutyrique
GFAP	"Glial Fibrillary Acidic Protein"
LC	locus coeruleus
NA	Noradrénaline
NRM	Noyau Raphé Magnus
OVX	Ovariectomisée
PR	Récepteurs de la progestérone
PSL	Ligation partielle du nerf sciatique
SGPA	Substance Grise Périacqueducule
SIA	Analgésie induite par le stress
SNC	Système nerveux central
SNI	«Spared nerve injury»
SNL	Ligation du nerf spinal
TENS	Stimulation électrique transcutanée

À mes parents,
Pour m'avoir donné
le goût d'apprendre

Introduction

1. Douleur et nociception

« L'homme est un apprenti, la douleur est son maître. Et nul ne se connaît tant qu'il n'a pas souffert. » *Alfred de Musset*

« Il faut garder à l'esprit que la douleur est un ennemi qui nous veut du bien. » *Anonyme*

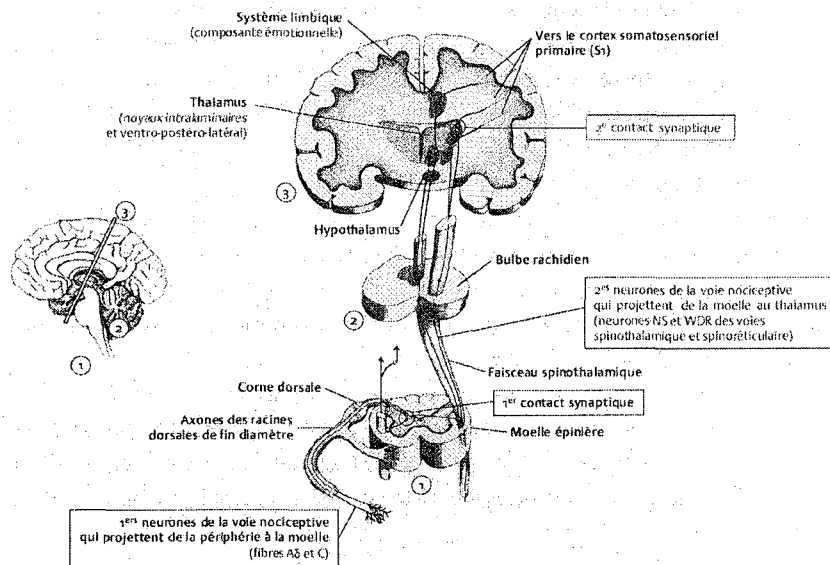
Ces deux citations reflètent bien la dualité à laquelle nous confronte la douleur : bien que peu agréable, elle est néanmoins nécessaire. La douleur, telle que décrite par l'International Association for the Study of Pain, est une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable résultant d'une lésion réelle ou potentielle ou décrites en de tels termes (IASP, 1979). La douleur est un phénomène très complexe puisqu'elle fait intervenir plusieurs mécanismes présents au niveau du système nerveux central et périphérique. Ces mécanismes endogènes influencent le trajet de la douleur, de la stimulation nociceptive jusqu'à la perception de la douleur, et ont un effet excitateur ou inhibiteur résultant en une augmentation ou une diminution du niveau de douleur ressenti. Finalement, la douleur est une sensation subjective puisqu'elle est influencée par de nombreux facteurs psychologiques, socio-culturels et physiologiques intervenant dans la perception de la douleur. Si la douleur joue un rôle essentiel en signalant un danger à l'organisme, il arrive parfois qu'elle devienne pathologique et non nécessaire.

Chez l'animal, l'utilisation du terme nociception est plus appropriée que celui de douleur, puisque celui-ci ne peut pas verbaliser la sensation douloureuse ressentie. La nociception est définie comme l'activité chimio-électrique de récepteurs et de fibres nerveuses provoquée par une stimulation potentiellement dangereuse pour l'organisme (IASP, 1979). L'évaluation de la douleur chez l'animal se fait donc par mesures indirectes suite à l'observation de certains comportements causés par des stimulations nociceptives.

2. Trajet de la douleur

Afin que la douleur soit perçue, l'information nociceptive doit être transmise jusqu'aux centres supérieurs par une série de mécanismes de transmission (voir figure 1). Cette transmission de l'information nociceptive se fait en trois étapes selon les différents niveaux, soit périphérique, spinal et supra-spinal, qui seront décrits dans les sections suivantes.

Figure 1 : Trajet de l'information douloureuse



Le trajet de l'information douloureuse fait intervenir trois neurones de la périphérie jusqu'aux centres supérieurs. L'information provenant de la périphérie est transmise par un premier neurone jusqu'à la moelle où un premier contact synaptique est fait avec le deuxième neurone. Ce neurone apporte l'influx au niveau des centres supérieurs où un deuxième contact synaptique est fait avec le troisième neurone. Ce dernier achemine l'information vers le système limbique et les centres corticaux.

Source : Marchand S. 2005. Neurophysiologie de la douleur. In *Pharmacologie de la douleur*, ed. P Beaulieu, ch 1, p.6. Les presses de l'Université de Montréal.

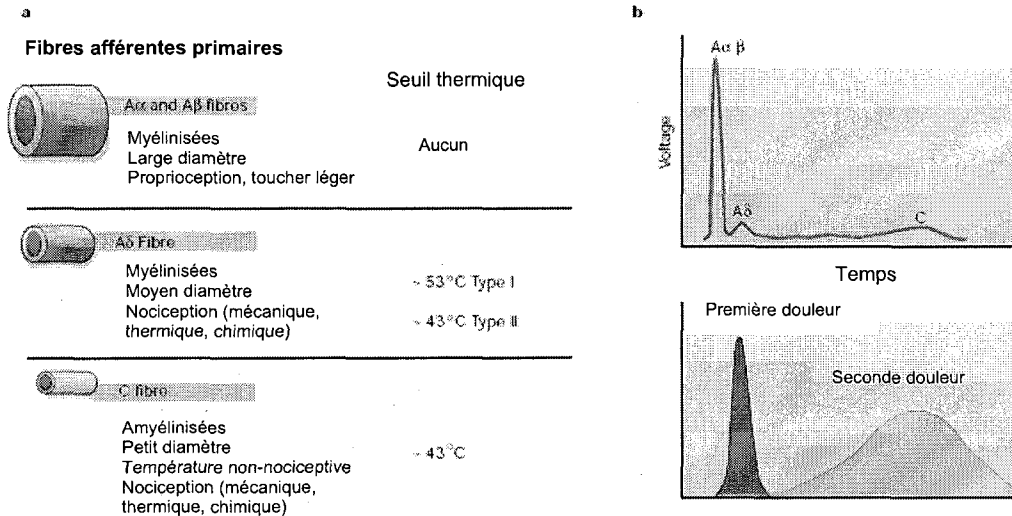
2.1 De la stimulation à la moëlle

Pour qu'il y ait douleur, il doit y avoir une stimulation nociceptive. Cette stimulation, première étape vers la perception de la douleur, peut être de nature mécanique, thermique ou chimique. Suite à une stimulation douloureuse, il se produit une libération de plusieurs substances par les cellules sanguines et les macrophages, tels la bradykinine, les prostaglandines, l'histamine, la sérotonine, les interleukines et la substance P (Le Bars & Adam, 2002). Ces substances vont contribuer à augmenter la sensibilité des nocicepteurs. Si la stimulation nociceptive est suffisamment intense, il y aura dépolarisation de la membrane et les nocicepteurs seront recrutés. Les nocicepteurs, ou récepteurs de la douleur, sont en fait des terminaisons nerveuses libres distribuées sur l'ensemble de la surface du corps ainsi que sur les muscles et les viscères. Ils ont comme particularité d'avoir un seuil de déclenchement élevé et nécessitent donc une stimulation intense afin de déclencher un potentiel d'action. Les nocicepteurs sont reliés aux différentes fibres nerveuses responsables de la conduction de l'information douloureuse jusqu'à la moëlle épinière. L'information nociceptive est transportée de la périphérie jusqu'aux cornes postérieures de la moëlle par le neurone afférent primaire. Ce neurone correspond en fait aux fibres nerveuses A δ et C.

Il existe trois grandes classes de fibres nerveuses sensibles : A β , A δ et C (voir figure 2). Ces fibres diffèrent par le type d'information qu'elles conduisent et par leur vitesse de conduction. Les fibres A β , les plus grosses, sont myélinisées et conduisent donc l'information à une vitesse très rapide de 35 à 75 m/s. Ces fibres jouent un rôle majeur dans la conduction des informations non-nociceptives comme le toucher, mais peuvent également contribuer à la modulation de la douleur en bloquant certaines informations nociceptives. Les fibres A δ sont également myélinisées, mais ont une vitesse de conduction plus lente (5 à 30 m/s) que les fibres A β due à leur plus petit diamètre. Comme leur seuil de recrutement est assez élevé, elles conduisent seulement de l'information nociceptive précise. La douleur ressentie via les fibres A δ est brève, rapide et est semblable à une sensation de piqûre. Ce sont les fibres A δ qui sont responsables de la première douleur suite à une stimulation nociceptive puisqu'elles répondent très rapidement. Finalement, les fibres C sont amyélinisées et conduisent l'information

nociceptive lentement (0,5 à 2 m/s) et de façon diffuse. Les fibres C sont responsables de la seconde douleur et la sensation ressentie via ces fibres est celle d'une brûlure. C'est la différence de vitesse de conduction des fibres qui permet de percevoir la première et la seconde douleur (Julius & Bas Baum, 2001).

Figure 2 : Types de fibres nerveuses



Il existe trois types différents de fibres nerveuses. Les fibres A δ et C sont responsables de l'information nociceptive alors que les fibres A β sont plutôt impliquées dans l'information concernant le toucher. Ces fibres sont responsables de la perception de la première et la seconde douleur.

Source : adaptée de Julius & Basbaum. *Molecular mechanisms of nociception*. Nature, Vol 413, 13 september 2001, 203-10

2.2 De la moëlle à l'intégration

Rendu au niveau des cornes postérieures de la moëlle épinière, le neurone afférent primaire fait un premier contact synaptique avec un neurone secondaire nociceptif spécifique ou non-spécifique. Les neurones nociceptifs spécifiques ne répondent qu'à des stimulations dont l'intensité est potentiellement dangereuse et ne sont recrutés que par les fibres A δ et C. Les neurones non-spécifiques, quant à eux, reçoivent des afférences des trois types de fibres nerveuses et répondent à des stimulations à la fois nociceptives et

non-nociceptives. Suite à ce contact synaptique, le neurone secondaire croise dans la moëlle épinière pour se diriger vers les noyaux latéraux du thalamus via la voie spinothalamique ou spinoréticulaire. C'est dans ces noyaux qu'un deuxième contact synaptique se fera avec le neurone tertiaire. Le faisceau spinothalamique projette les informations nociceptives provenant des lames I, IV, V et VI de la moëlle vers les noyaux thalamiques. Ce faisceau est responsable de l'aspect sensori-discriminatif de la douleur en permettant la localisation et la perception du stimulus douloureux. Les afférences parvenant au faisceau spinoréticulaire proviennent des lames profondes VII et VIII et font des projections se dirigeant vers le tronc cérébral, le thalamus et le cortex. Le faisceau spinoréticulaire, qui joue un rôle dominant dans la mémoire et les émotions, est responsable de l'aspect désagréable de la douleur. Finalement, le neurone tertiaire conduit les informations nociceptives vers différentes régions du cortex somatosensoriel et quelques structures limbiques où il y aura finalement perception de la douleur (Marchand, 2005). Durant le trajet de l'information nociceptive, le neurone secondaire fait aussi divers contacts synaptiques dans certaines régions du tronc cérébral dont la substance grise périaqueducatale (SGPA) et les noyaux du raphé magnus (NRM). Ces contacts vont permettre, entre autres, la mise en place d'un système endogène d'inhibition de la douleur, dont il sera question plus en détails dans la section 4.

3. Douleur neuropathique

3.1 Classification de la douleur

Il est possible de classer la douleur selon une échelle temporelle ou selon le type de douleur. De façon temporelle, la douleur se répartit en trois catégories, soit aiguë, sub-aiguë et chronique. La douleur aiguë, qui est transitoire, survient suite à une blessure et agit comme signal d'alarme pour l'organisme. Elle est généralement peu problématique, puisque son origine est souvent plus facile à identifier et qu'elle se traite facilement à l'aide des anti-inflammatoires et analgésiques habituels. Il est question de douleur sub-aiguë lorsque la douleur est encore présente au-delà de trois mois et une douleur est considérée comme étant chronique lorsque celle-ci persiste au-delà de six mois. Contrairement à la douleur aiguë, la douleur chronique est non nécessaire, voire même

pathologique, car elle peut entraîner des dysfonctions de l'organisme. La douleur chronique diffère de la douleur aiguë non seulement dans sa durée et son déclenchement, mais surtout dans ces mécanismes sous-jacents qui sont très variés et plus complexes et qui seront vus dans la section 3.4. Comme elle peut survenir sans blessure ou inflammation identifiable, la douleur chronique est donc beaucoup plus difficile à traiter que la douleur aiguë.

On retrouve deux types différents de douleur, la douleur nociceptive et la douleur neurogénique (Marchand, 2005). Tout d'abord, la douleur nociceptive, qui peut être soit somatique, viscérale ou inflammatoire, est généralement transitoire et fait suite à une stimulation douloureuse de nature chimique, thermique ou mécanique. La douleur nociceptive somatique est une douleur superficielle ou profonde due à une stimulation des nocicepteurs retrouvés sur les tissus ou les muscles, comme dans le cas d'une brûlure, d'une piqûre ou d'une coupure. Les douleurs nociceptives viscérales résultent d'une stimulation des nocicepteurs retrouvés au niveau des viscères ou d'une distension des viscères, comme lors d'une crise d'appendicite. La douleur nociceptive inflammatoire, par exemple l'arthrite, se caractérise par des lésions tissulaires ou de l'inflammation, produisant une hyperalgésie causée par la réparation tissulaire et jouant un rôle protecteur et réparateur. Ensuite, la douleur neurogénique, ou douleur neuropathique, est causée par un dommage ou une dysfonction du système nerveux central ou périphérique, comme dans le cas de la névralgie du trijumeau. La douleur neurogénique peut aussi résulter d'une dysfonction du système nerveux central ayant pour effet d'activer des systèmes excitateurs ou de bloquer les systèmes inhibiteurs de la douleur, comme dans la fibromyalgie. Dans le cadre de mon projet de recherche, une attention particulière a été portée à la douleur neuropathique causée par une dysfonction du système nerveux périphérique qui sera décrite en détails dans cette section.

3.2 Généralités sur la douleur neuropathique

En général, la douleur constitue un signal d'alarme contre les stimuli dommageables pour l'organisme et le protège en déclenchant des réactions dont la finalité est de diminuer les causes et les conséquences de ces stimuli. Par contre, lorsque les mécanismes de contrôle

de la douleur deviennent défectueux, la douleur peut devenir chronique, pathologique et inutile du point de vue physiologique. C'est le cas des douleurs neuropathiques, des douleurs chroniques persistantes causées par une atteinte ou une dysfonction du système nerveux, soit au niveau des nerfs périphériques, des ganglions de la racine dorsale, de la racine dorsale ou du système nerveux central (Woolf & Mannion, 1999). L'étiologie de la douleur neuropathique est très variée et plusieurs pathologies peuvent entraîner des désordres d'ordre neuropathique. La douleur neuropathique peut être due, entre autres, à des blessures mécaniques du nerf (syndrome du tunnel carpien), à des maladies métaboliques (neuropathie diabétique), à des infections virales (herpès zoster) et à des maladies immunologiques (sclérose en plaques) (Zimmermann, 2001).

En raison des mécanismes et de l'étiologie très complexes de ce type de douleur, il est difficile de bien traiter les patients atteints de douleur neuropathique. En effet, ces patients ne répondent que très faiblement aux thérapies anti-douleurs et aux analgésiques habituels, tels la morphine et les anti-inflammatoires non stéroïdiens. Ces patients sont alors traités avec des antidépresseurs et des anti-convulsivants. Toutefois, ces médicaments ont une efficacité limitée pour ce type de traitement et ont un nombre important d'effets indésirables (Kingery, 1997; Koltzenburg & Scadding, 2001).

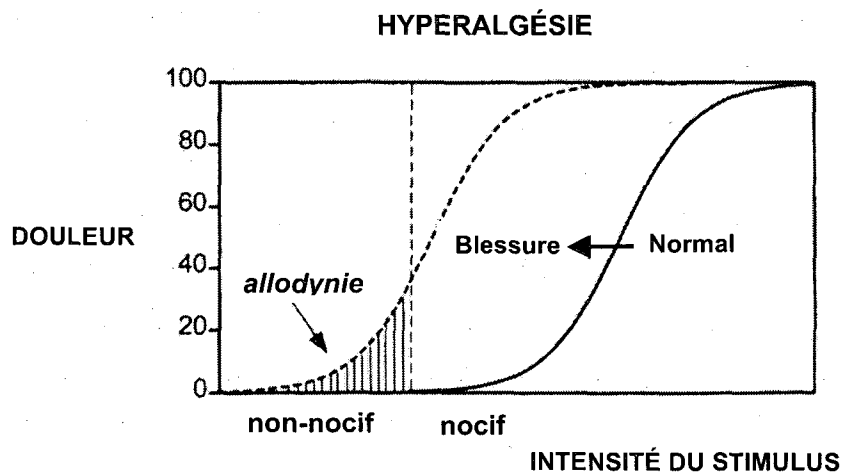
3.3 Caractéristiques de la douleur neuropathique

La douleur neuropathique périphérique, la plus commune, peut se manifester de deux façons, soit par la douleur évoquée ou par la douleur spontanée. La douleur spontanée peut survenir sans la présence d'un stimulus et est ressentie sous forme de choc électrique, de brûlure ou de douleur lancinante. La douleur évoquée nécessite un stimulus et est une composante importante des lésions des nerfs périphériques. La douleur évoquée se caractérise par deux éléments cruciaux dans la douleur neuropathique : l'allodynie et l'hyperalgésie (Woolf & Mannion, 1999). L'allodynie est une réponse douloureuse à un stimulus qui est normalement de type non douloureux ou à un stimulus dont l'intensité est généralement insuffisante pour causer de la douleur, alors que l'hyperalgésie est une réponse douloureuse exagérée à un stimulus habituellement douloureux (voir figure 3). L'allodynie tactile mettrait en jeu les fibres afférentes A β alors que l'hyperalgésie

thermique mettrait en jeu via les fibres C (Yaksh, 1989; Lekan et al., 1996; Ossipov et al., 1999). Chez l'humain, les symptômes correspondant à la douleur neuropathique sont l'allodynie, l'hyperalgésie et une combinaison de déficits tels une perte de sensation, une dysesthésie (sensation anormale déplaisante spontanée ou évoquée) et une paresthésie (sensation anormale spontanée ou évoquée) (Woolf & Mannion, 1999).

Dans un modèle animal de douleur neuropathique, il est possible d'évaluer la douleur en mesurant trois caractéristiques comportementales, soit l'hyperalgésie, l'allodynie et l'autotomie. Il existe trois différentes modalités pour évaluer l'hyperalgésie et l'allodynie. Ces modalités varient selon le stimulus utilisé, soit un stimulus thermique, mécanique ou chimique. Dans les cas d'autotomie, l'animal s'administre des soins résultant en blessures, morsures et pouvant même aller jusqu'à l'amputation du membre atteint (Wall et al., 1979; Zimmermann, 2001).

Figure 3 : Allodynie et hyperalgésie



L'allodynie se caractérise par une sensation douloureuse en réponse à un stimulus dont l'intensité est normalement insuffisante pour causer de la douleur. De plus, un stimulus qui est de nature non nociceptive peut également causer de la douleur chez des sujets atteints d'allodynie. L'hyperalgésie est une sensation douloureuse exagérée à un stimulus qui est habituellement douloureux.

Source : adaptée de Cervero & Laird, *Mechanisms of touch-evoked pain (allodynia): a new model*. Pain. 1996 Nov;68(1):13-23

3.4 Mécanismes de la douleur neuropathique

L'origine exacte des douleurs neuropathiques demeure encore nébuleuse, bien que plusieurs mécanismes soient plus reconnus. Dans cette section, les mécanismes les plus importants et les plus étudiés seront expliqués.

3.4.1 Canaux sodiques

Une des premières hypothèses à avoir été mise de l'avant est celle impliquant les canaux sodiques. Une étude a démontré que suite à une lésion nerveuse, il se produisait une accumulation et une augmentation de la densité des canaux sodiques voltages dépendants de type NaV au site proximal de cette lésion. Ceci aurait pour effet de causer l'hyperexcitabilité et la décharge ectopique des neurones produisant ainsi des potentiels d'action spontanés qui seraient responsables du développement de la douleur neuropathique (Matzner & Devor, 1994).

3.4.2 GABA

La douleur neuropathique peut également être causée par une diminution de la concentration de certaines molécules. Plusieurs études ont démontré que l'acide γ -aminobutyrique (GABA), un neurotransmetteur inhibiteur, serait probablement impliqué dans la douleur neuropathique. Des chercheurs ont observé une diminution de GABA dans la moelle épinière chez le rat suite à une transection du nerf sciatique (Castro-Lopes et al., 1993) de même qu'une diminution de l'enzyme de synthèse du GABA (Moore et al., 2002). De plus, une étude a démontré qu'en injectant de façon intrathécale une seule dose de GABA chez des animaux avec une constriction chronique du nerf sciatique, les comportements d'hyperalgésie thermique et mécanique observés pouvaient être renversés (Eaton et al., 1999). Également, l'efficacité relative des anti-épileptiques, qui miment l'action du GABA, dans le traitement de la douleur neuropathique, porte à croire qu'une diminution de GABA serait bel et bien impliquée dans le développement de la douleur neuropathique (Rosenberg et al., 1997).

3.4.3 Récepteurs NMDA

Les récepteurs NMDA sont des récepteurs de type ionotropes activés principalement par le glutamate, qui est le principal neurotransmetteur excitateur. Une activation excessive de ces récepteurs est responsable d'une sensibilisation spinale et centrale. En répétant plusieurs fois un stimulus douloureux, le niveau de douleur ressenti augmente, et ce même si la force du stimulus est inchangée : c'est la sensibilisation centrale. En administrant de la kétamine, un modulateur des récepteurs NMDA, il est possible d'empêcher cette sensibilisation centrale, démontrant ainsi que les récepteurs NMDA sont bien impliqués dans cette sensibilisation (Howard, 1994). De plus, l'activation des récepteurs NMDA par leur phosphorylation corrèle avec la présence de signes de neuropathie, comme l'allodynie (Woolf & Salter, 2000; Ultenius et al., 2006). Finalement, dans une étude réalisée chez des patients avec douleur neuropathique, un traitement avec un antagoniste des récepteurs NMDA a été efficace pour réduire l'hypersensibilité et la douleur chez ces patients (Nelson et al., 1997).

3.4.4 Autres mécanismes

De nombreuses autres hypothèses concernant l'origine de la douleur neuropathique ont fait l'objet d'études; en voici quelques unes. Tout d'abord, une dysfonction des contrôles inhibiteurs diffus nociceptifs (CIDN) pourrait aussi jouer un rôle dans la douleur neuropathique. En effet, selon l'étude de Zimmermann, les animaux avec des lésions nerveuses auraient des CIDN 50% moins efficaces que les animaux sains (Zimmermann, 1991). Ces données semblent être confirmées par un déficit des CIDN dans différentes conditions de douleur chronique, comme la fibromyalgie (Julien et al., 2005). Dans les cas de douleur neuropathique, une régulation à la hausse de la cholécystokinine, un inhibiteur endogène des récepteurs opioïdiques, serait observée (Willis & Coggeshall, 1991). Finalement, le système opioïdique pourrait être défectueux, car une baisse de β -endorphine et de sa liaison aux récepteurs opioïdiques est observée (Panerai et al., 1987).

3.4.5 Cellules gliales

De nombreuses évidences démontrent l'implication des cellules gliales dans la douleur neuropathique. Puisque les cellules gliales sont parties intégrantes de mon projet de recherche, une section entière leur sera consacrée.

4. Cellules gliales

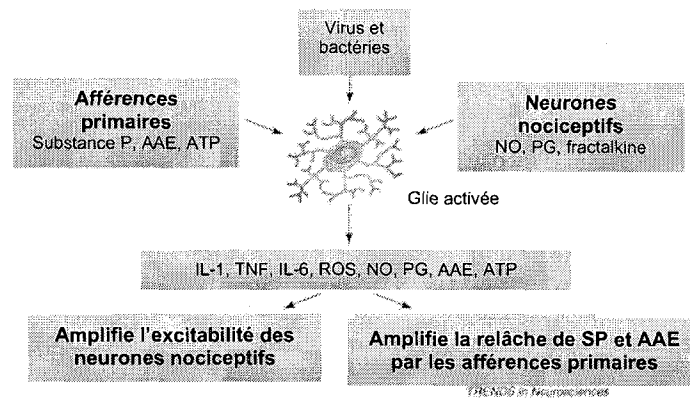
Le système nerveux est composé de plusieurs types de cellules nerveuses. Parmi celles-ci, les neurones, qui sont responsables de la communication neuronale et de la transmission de l'information. De plus, de nombreuses cellules gliales apportant un rôle de soutien aux neurones. Il existe différents types de cellules gliales ayant des fonctions distinctes au niveau du système nerveux. Les plus abondantes sont les astrocytes qui ont pour rôle de fournir les nutriments nécessaires aux neurones et aux capillaires. La microglie agit comme macrophage afin de protéger les neurones puisque les cellules du système immunitaire n'ont pas accès au système nerveux central (SNC). Finalement, les oligodendrocytes forment les gaines de myélines servant à isoler les neurones. En plus de ces diverses fonctions, il est maintenant connu que les cellules gliales seraient impliquées dans d'autres processus, comme la communication neuronale et la douleur. Les cellules gliales, particulièrement la microglie, possèdent plusieurs caractéristiques communes aux cellules du système immunitaire (Watkins et al., 2001a). Tout d'abord, elles peuvent être activées par des pathogènes et une fois activées, elles vont relâcher diverses substances pro-inflammatoires, entre autres, des cytokines ou des prostaglandines. L'activation des cellules gliales est caractérisée par une hypertrophie et une prolifération des cellules et également par une augmentation de production de certaines protéines, comme le GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), spécifique aux astrocytes (Gehrmann et al., 1995). Pour évaluer l'activation des cellules gliales, il est donc possible d'utiliser l'expression de ces protéines comme indice anatomique que la glie a bien été activée. De nombreuses études ont démontré que seul le marqueur des astrocytes, le GFAP, est en corrélation avec la réponse douloureuse alors qu'il n'y a pas de corrélation entre le marqueur de la microglie et la réponse douloureuse observée (Colburn et al., 1997; Colburn et al., 1999; Hashizume et al., 2000; Winkelstein & DeLeo, 2002). En effet, le niveau d'expression du marqueur de la microglie est indépendant des comportements douloureux observés. Par

exemple, il est possible d'observer une forte activation de la microglie au niveau de la moëlle même si aucun comportement douloureux n'est observé. L'inverse est également possible, soit une réponse douloureuse alors qu'aucune activation de la microglie ne peut être observée au niveau de la moëlle.

4.1 Mécanismes d'action

Les cellules gliales ne semblent pas impliquées dans la douleur aiguë ou non-pathologique (Watkins et al., 2001). Elles sont toutefois présentes sans pour autant être activées. Dans la douleur aiguë, les signaux de douleur arrivent via les fibres nociceptives A δ et C et causent une amplification de la relâche de substance P et d'acides aminés excitateurs par les fibres nociceptives. La liaison des récepteurs NK-1 par la substance P et celle des récepteurs AMPA par les acides aminés excitateurs activent ces récepteurs et ainsi causent la dépolarisation des neurones, tel qu'illustré à la figure 4. Dans le cas d'une douleur persistante, les cellules gliales sont activées et deviennent hypertrophiées. Plusieurs substances peuvent activer les cellules gliales, soit des pathogènes, comme des virus ou des bactéries, ou les diverses substances relâchées par les neurones nociceptifs et les fibres afférentes primaires comme la substance P, les acides aminés excitateurs et le NO (Scholz & Woolf, 2007). Une fois activées, les cellules gliales relâchent plusieurs médiateurs pro-inflammatoires (cytokines, prostaglandines, interleukines), ce qui a pour effet global d'augmenter l'excitabilité des neurones nociceptifs et d'amplifier la relâche de substances par les fibres afférentes primaires (Oka & Hori, 1999). De plus, l'activation des astrocytes entraîne une diminution de leurs transporteurs (GLT-1) au glutamate, ce qui a pour conséquence de réduire la recapture de cet acide aminé excitateur impliqué dans la douleur. Généralement, l'activation des astrocytes survient suite à l'activation de la microglie. Suite à la lésion d'un nerf, les macrophages se rendent immédiatement au site de la lésion et deviennent activés. De nombreux médiateurs sont relâchés par les axones endommagés et causent de l'inflammation. Une accumulation de macrophages, de lymphocytes et de microglie se produit. L'activation et la prolifération des astrocytes surviennent quelque temps plus tard et progressent lentement, mais durent plus longtemps que la prolifération et l'activation de la microglie (Scholz & Woolf, 2007).

Figure 4 : Implication des cellules gliales dans la douleur



Dans une douleur persistante, les cellules gliales sont activées par des pathogènes et par les diverses substances relâchées par les fibres afférentes primaires et les neurones nociceptifs. Une fois activées, elles relâchent plusieurs substances pro-inflammatoires. (AAE : acides aminés excitateurs, NO : nitric oxide, PG : prostaglandines, SP : substance P)

Source : Watkins LR, Glial activation : a driving force for pathological pain, Trends in Neuroscience Vol.24 August 2001

4.2 Cellules gliales et douleur

De nombreuses évidences démontrent l'implication des cellules gliales dans la douleur chronique. Tout d'abord, l'activation des cellules gliales est observée dans différents modèles animaux de douleur neuropathique (Colburn et al., 1999; Hashizume et al., 2000; Winkelstein et al., 2001; Watkins et al., 2003). En effet, l'activation des cellules gliales est une des caractéristiques du système nerveux central en réponse à une lésion du système périphérique ou central (Colburn et al., 1999). Par exemple, suite à une constriction de la racine dorsale ou à l'induction d'un cancer des os chez la souris, une hypertrophie massive des astrocytes est observée (Schwei et al., 1999; Hashizume et al., 2000). Une étude faite chez des rats dans un modèle de constriction chronique du nerf sciatique a également démontré une augmentation de la densité du GFAP du côté ipsilatéral comparativement au côté controlatéral (Garrison et al., 1991). Cette étude a comparé la densité du GFAP dans trois régions de la moëlle épinière soit les régions L1, L4 et cervical. L'augmentation du GFAP a seulement été observée dans la section L4,

soit la région où se projette le nerf sciatique. Ce résultat signifie que l'activation des astrocytes ne se fait pas dans toute la moëlle, mais seulement dans celle qui correspond à la région atteinte.

Ensuite, l'activation des cellules gliales a été démontrée comme étant à la fois nécessaire et suffisante pour créer de la douleur pathologique. Tout d'abord, les cellules gliales seraient capables à elles seules de générer de la douleur. Comme mentionné précédemment, les cellules gliales peuvent être activées par des pathogènes. Deux études ont démontré qu'en injectant de façon intrathécale un pathogène se liant à des récepteurs spécifiques à la glie, il était possible de recréer une douleur caractérisée par de l'hyperalgésie et de l'allodynie (Meller et al., 1994; Milligan et al., 2000). Non seulement les cellules gliales sont suffisantes pour générer de la douleur, mais elles sont également nécessaires. De même, quelques études ont démontré que des états de douleur exagérée pouvaient être bloqués par des agents perturbant l'activation des cellules gliales (Watkins et al., 2001b) Il est donc possible de prévenir ou de renverser les comportements douloureux associés à l'activation des cellules gliales en administrant des agents perturbant ou inhibant l'activation de ces cellules (Meller et al., 1994; Milligan et al., 2000; Sweitzer et al., 2001). Par exemple, un inhibiteur des astrocytes administré avant une transection du nerf spinal a diminué l'allodynie observée après la chirurgie comparativement aux animaux n'ayant pas reçu cet inhibiteur (Sweitzer et al., 2001).

Il semble donc de plus en plus évident que les cellules gliales jouent un rôle important dans la création et le maintien de la douleur neuropathique.

5. Mécanismes endogènes de modulation de la douleur

Précédemment, de nombreux exemples ont été apportés démontrant qu'il existe au niveau de l'organisme des systèmes facilitateurs de douleur. Heureusement, des systèmes pouvant contrôler la douleur et ainsi en diminuer sa transmission ou sa perception sont également présents. Ces systèmes de modulation de la douleur peuvent agir au niveau spinal et supra-spinal. Les mécanismes de modulation de la douleur peuvent donc avoir

un effet excitateur, c'est-à-dire faciliter la transmission de l'information douloureuse, ou plutôt un effet inhibiteur en diminuant le signal nociceptif et ainsi produire une analgésie. La douleur est donc le résultat de la balance entre ces mécanismes excitateurs et inhibiteurs (Millan, 2002).

5.1 Mécanisme excitateurs

5.2.1 Mécanismes excitateurs spinaux

Les mécanismes excitateurs peuvent induire une sensibilisation centrale au niveau spinal. Cette sensibilisation centrale se caractérise par une augmentation de l'excitabilité et des décharges spontanées des neurones spinaux nociceptifs et par une réponse amplifiée des neurones spinaux aux influx nociceptifs (hyperalgésie) et non-nociceptifs (allodynie). Comme il a été discuté dans la section 3.4.3, la sensibilisation centrale est causée par l'activation des récepteurs NMDA, qui eux sont activés par une relâche soutenue de glutamate (Woolf & Salter, 2000). Ce sont les mécanismes responsables de la sensibilisation centrale qui sont responsables de la modification des circuits nociceptifs spinaux et qui contribuent à la persistance de la douleur.

5.2.2 Mécanismes excitateurs supra-spinaux

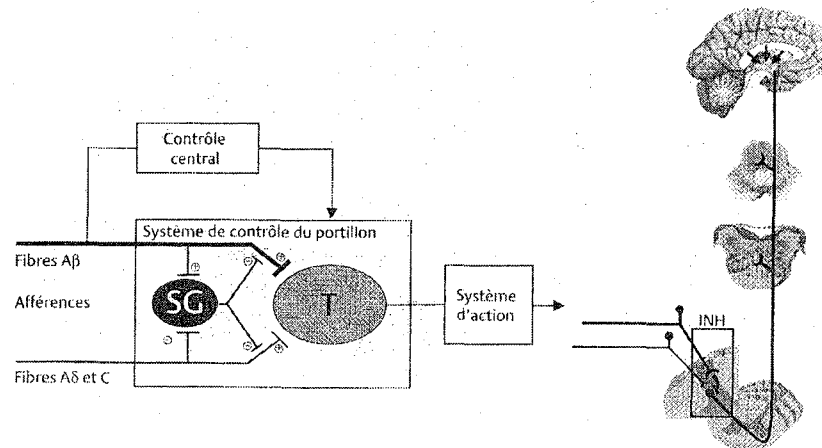
Des études récentes ont démontré que certaines conditions physiologiques, comme une hyperactivité nociceptive, peuvent changer la réponse neuronale habituelle à des neurotransmetteurs spécifiques. Un bon exemple est la réponse hyperalgésique parfois observée chez des patients utilisant des opioïdes à fortes doses. Ces drogues peuvent donc, dans certaines circonstances, produire un effet complètement opposé et amplifier la douleur en produisant une réponse hyperalgésique (Simonnet & Rivat, 2003; Davis et al., 2007). Un autre exemple est le GABA, un neurotransmetteur inhibiteur, mais qui a été démontré comme pouvant avoir un effet excitateur sur les neurones en réduisant l'expression du transporteur synaptique KCC2, ce qui a pour effet de créer un déséquilibre de l'homéostasie anionique provoquant ainsi le déclenchement de potentiels d'action (Coull et al., 2003).

5.2 Mécanisme inhibiteurs

5.2.1 Mécanismes inhibiteurs spinaux

Il existe plusieurs mécanismes de modulation de la douleur au niveau spinal, le principal étant la théorie du portillon décrite par Melzack & Wall en 1965 (Melzack & Wall, 1965). Cette théorie stipule qu'en stimulant les fibres A β responsables de la sensation du toucher, il y a recrutement d'interneurones inhibiteurs dans la substance gélatineuse des cornes postérieures de la moëlle. Ces interneurones inhibiteurs font un contact synaptique avec les fibres responsables de la transmission de l'information douloureuse, soit les fibres A δ et C. Il y a donc une inhibition des afférences nociceptives de ces fibres douloureuses. Il est également possible de recruter les fibres A β par le toucher léger ou par la stimulation électrique transcutanée à basse intensité (TENS), ce qui produit une analgésie localisée.

Figure 5 : Théorie du portillon



Lorsque les fibres A β sont recrutées, un interneurone inhibiteur est activé afin de réduire la transmission des informations nociceptives pour la région de la moëlle associée à la stimulation tactile.

(SG : substance gélatineuse des cornes postérieures de la moelle, T : thalamus)

Source : Marchand S. 2005. Neurophysiologie de la douleur. In *Pharmacologie de la douleur*, ed. P Beaulieu, ch 1, p.24. Les presses de l'Université de Montréal.

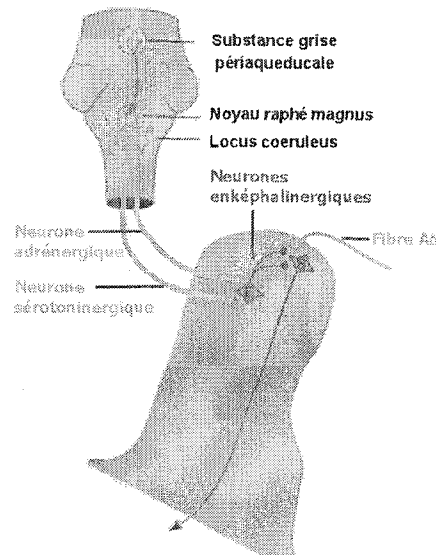
5.2.2 Mécanismes inhibiteurs supra-spinaux

Il est possible de diviser en deux grandes classes les mécanismes d'inhibition de la douleur au niveau supra-spinal. Tout d'abord, les contrôles inhibiteurs diffus nociceptifs produisent une analgésie généralisée en inhibant l'information nociceptive. Il est également possible de contrôler la douleur en agissant sur les centres supérieurs à l'aide de certaines techniques, comme l'hypnose.

5.2.2.2 Contrôles inhibiteurs diffus nociceptifs (CIDN)

Comme mentionné précédemment, lorsque les influx nociceptifs sont transmis via les afférences du faisceau spinothalamique aux centres supérieurs, des contacts synaptiques sont faits dans le tronc cérébral, plus spécifiquement au niveau de la SPGA et des NRM. Ces contacts recrutent des voies inhibitrices descendantes qui à leur tour envoient des efférences sérotoninergiques et noradrénergiques jusque dans les cornes dorsales de la moëlle. Ces efférences activent des interneurons inhibiteurs enképhalinergiques au niveau des lames supérieures des cornes dorsales afin de libérer des enképhalines et ainsi provoquer une analgésie opioïdérique diffuse. De plus, la sérotonine, qui provient des neurones sérotoninergiques, peut agir directement sur les neurones nociceptifs de la corne dorsale afin de les inhiber (Le Bars et al., 1979; Talbot et al., 1989).

Figure 6 : Contrôles inhibiteurs diffus nociceptifs (CIDN)



Lors de la transmission de l'information nociceptive de la moelle aux centres supérieurs, des contacts synaptiques sont fait dans certaines régions du tronc cérébral (SGPA, NRM et LC). Les régions activées envoient des projections sérotoninerigiques et noradrénergiques afin de stimuler des interneurones inhibiteurs à libérer des enképhalines. Ces opioïdes inhibent la transmission du message nociceptif provenant de la périphérie et créent une analgésie diffuse.

Source : adapté de Zigmond, M.J., Bloom, F.E., Landis, S.C., Roberts, J.L. et Squire, L.R. *Fundamental Neuroscience*, Academic Press, San Diego, 1999, p.777.

En clinique, ces mécanismes inhibiteurs sont intéressants, car il est de plus en plus évident que certains états de douleur chronique seraient dues à un déficit de ces mécanismes endogènes, particulièrement dans le cas de la fibromyalgie ou dans les migraines, où la sensation de douleur diffuse semble reliée à un déficit des CIDN (Julien et al., 2005; Pielsticker et al., 2005). La douleur chronique ne serait donc plus seulement le résultat d'une augmentation des afférences nociceptives. Au niveau expérimental, il existe différentes techniques pour recruter les CIDN, par exemple l'analgésie induite par le stress qui a été utilisée dans ce projet de recherche afin de recréer chez la souris une analgésie opioïdergique comparable à celle créée par les CIDN.

5.2.2.3 Contrôles des centres supérieurs

Au niveau des centres supérieurs, les mécanismes de contrôle de la douleur relèvent surtout de la manipulation cognitive de la perception douloureuse. Comme les centres supérieurs sont responsables de l'intégration de l'information douloureuse, il peut être intéressant de moduler la perception à ce niveau. Parmi ces manipulations cognitives, les plus reconnues sont la relaxation, l'hypnose et le biofeedback. La relaxation serait efficace pour réduire les tensions musculaires et le stress pouvant être associés à une douleur (Linton & Gotestam, 1984; Thomas, 1988). L'hypnose, caractérisée par un état de conscience altéré qui s'accompagne d'une relaxation profonde (Spiegel, 1991) est de plus en plus utilisée pour moduler la douleur (Rainville et al., 1999; Rainville et al., 2002). Cette technique pourrait, entre autres, aider à réduire les douleurs dans les cas d'accouchement ou de cancer. En effet, une étude a démontré que les patientes ayant subi une chirurgie pour un cancer du sein et ayant participé à une séance d'hypnose ressentaient moins de douleur, de nausées et de fatigue que celles n'ayant pas été hypnotisées (Montgomery et al., 2007).

6. Hormones sexuelles

6.1 Différences entre les sexes

De nombreuses différences existent entre les hommes et les femmes au niveau de la perception sensorielle. Par exemple, les femmes possèdent un sens de l'odorat, du goût et du toucher plus développé que les hommes (Velle, 1987). Il n'est donc pas surprenant de retrouver également des différences au niveau de la perception de la douleur. En effet, les femmes possèdent des seuils de douleurs inférieurs aux hommes. Il a été démontré que les femmes perçoivent un stimulus équivalent comme plus douloureux et ont moins de tolérance pour des stimuli intenses que les hommes (Berkley, 1997). Par ailleurs, la prévalence de condition douloureuse chronique, tel la fibromyalgie, les migraines ou le syndrome du colon irritable, est plus élevée chez les femmes que chez les hommes. Les femmes sont également plus susceptibles de vivre avec des douleurs chroniques et ce, avec des niveaux de douleur plus sévères (Unruh, 1996). De plus, une étude a montré que les seuils de douleur varient chez les femmes en fonction de la phase du cycle menstruel, la phase folliculaire étant associée à des seuils de douleur plus élevés lors de douleur

expérimentale (Riley, III et al., 1999). La réponse aux analgésiques tels les opioïdes diffèrent également selon le sexe (Fillingim & Ness, 2000). Par exemple, les femmes auraient un meilleur taux de réponse aux opioïdes kappaergiques que les hommes (Gear et al., 1996). Plusieurs facteurs ont été proposés pour expliquer ces phénomènes, que ce soit des facteurs psychologiques, socioculturels ou physiologiques. De plus en plus, ces différences sont expliquées par le rôle des hormones sexuelles. Il est donc très pertinent d'étudier le rôle de ces hormones dans la douleur, puisque comme mentionné, les femmes sont plus souvent atteintes de douleurs chroniques et une prévalence de certaines maladies selon le sexe est également observée. Cependant, bien qu'il soit maintenant accepté que ces différences soient dues en partie aux hormones sexuelles, le rôle précis des hormones sexuelles ainsi que de leurs récepteurs dans les différents types de douleur restent à être élucidés pour une meilleure compréhension de ce phénomène.

6.2 Généralités sur les hormones sexuelles

Il existe trois types d'hormones sexuelles, soit les estrogènes, la progestérone et les androgènes. Les hormones sexuelles sont produites et sécrétées en majorité par les gonades suite à une stimulation par la gonadotrophine, mais peuvent également être produites par les glandes surrénales suite à l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien. Les hormones sexuelles peuvent également être synthétisées *de novo* au niveau du cerveau, dans le tissu adipeux ou dans le foie dans le cas d'un stress intense (Mensah-Nyagan et al., 1999). Par contre, chez les rongeurs, les gonades sont la seule source d'hormones sexuelles. En effet, l'enzyme P450c17 nécessaire à la synthèse des hormones sexuelles au niveau de la glande surrénale n'est pas présente chez les rongeurs.

L'effet des hormones sexuelles peut être organisationnel ou activationnel. L'effet organisationnel est un effet présent depuis la naissance qui induit des changements permanents, par exemple la structure du corps et les fonctions sexuelles. Par contre, l'effet activationnel est un effet transitoire qui est perdu si le niveau d'hormones sexuelles diminue rapidement, par exemple lors d'une gonadectomie chez l'animal. Ces hormones jouent évidemment un rôle crucial au niveau des fonctions reproductives, mais sont également reconnues pour leurs rôles dans les fonctions immunitaires, les fonctions

cognitives, dans la modulation neuronale et dans la douleur (Aloisi, 2003). Si la testostérone est considérée comme l'hormone «mâle» alors que les estrogènes et la progestérone sont considérées comme les hormones «femelles», il est toutefois bien connu que les trois hormones se retrouvent à la fois chez l'homme et la femme, mais dans des concentrations différentes.

6.3 Mécanismes d'action

Les hormones sexuelles sont des hormones stéroïdiennes formées à partir du cholestérol suite à des modifications enzymatiques. Ces hormones, étant liposolubles, diffusent à travers les membranes afin de se lier aux récepteurs nucléaires qui leur sont propres, soit ER- α et ER- β pour l'estrogène, PR pour la progestérone et AR pour la testostérone (Tsai & O'Malley, 1994). Les récepteurs sont localisés dans plusieurs régions du SNC comme la substance grise périaqueducatale, le locus coeruleus, le système limbique et le thalamus et également en périphérie sur les organes cibles (Papka et al., 1998; Scott et al., 1998; VanderHorst et al., 1998; Kastrup et al., 1999; Aloisi, 2000; Aloisi, 2003). Les hormones sexuelles peuvent agir de deux façons, soit de façon directe dite non-génomique et de façon indirecte dite génomique. Dans l'action génomique, la liaison de l'hormone à son récepteur permet au complexe d'entrer dans le noyau et d'entraîner une homo- ou hétérodimérisation des récepteurs permettant ainsi la liaison du récepteur à une protéine réceptrice liée à l'ADN. L'induction de la transcription des gènes cibles en ARNm, suivi de la traduction entraînera une production de protéines. L'effet génomique prend donc quelques heures avant de faire son effet. L'effet non-génomique quant à lui est très rapide et a lieu après quelques minutes, car les hormones sexuelles agissent directement par un site de liaison sur la membrane plasmique ou par liaisons à des récepteurs membranaires (Deroo & Korach, 2006). Les actions directes des hormones sexuelles peuvent se faire en altérant la perméabilité membranaire pour certains neurotransmetteurs ou en modifiant la concentration de neurotransmetteurs (Marcus, 1995).

Par rapport à la douleur, les hormones peuvent avoir un effet en modifiant la synthèse, la relâche et la recapture de certains neurotransmetteurs impliqués dans la modulation de la douleur incluant la sérotonine, l'acétylcholine, la dopamine, les opioïdes, et le GABA

(Aloisi, 2003). De fait, un changement de la concentration plasmatique d'estrogène est accompagné par un changement de la concentration de certains neurotransmetteurs comme la sérotonine, l'acétylcholine la dopamine et les β -endorphines. Par exemple, une diminution d'estrogène amène une baisse de sérotonine, ce qui pourrait donc amener une diminution des effets inhibiteurs de la sérotonine dans les CIDN (Marcus, 1995). Au niveau du cerveau et de la moëlle épinière, les hormones sexuelles peuvent sensibiliser les neurones de la moëlle et du cerveau et ainsi faciliter les potentiels d'actions et par le fait même la transmission de l'influx douloureux. Également, des études ont démontré que les récepteurs des hormones sexuelles et des opioïdes étaient co-localisés (Kest et al., 2000; Aloisi et al., 2002). De plus, les hormones sexuelles, en particulier les estrogènes, modulent le niveau d'ARNm des peptides opioïdiques et les niveaux protéiques des peptides et récepteurs opioïdiques (Weiland & Wise, 1990; Sinchak et al., 2000).

6.4 Estrogènes

Les estrogènes regroupent plusieurs molécules dont les plus connues sont le 17β -estradiol et l'estrone et agissent différemment selon leur affinité avec les récepteurs des estrogènes (ER). Les estrogènes possèdent deux sous-types de récepteurs spécifiques, soit ER- β et ER- α , qui sont présents à différentes concentrations et localisés différemment. Chez le rat, les récepteurs ER- α , en plus d'être exprimés dans le SNC, se retrouvent au niveau de l'utérus, des testicules, des ovaires, des reins et des glandes surrénales, ce qui explique que les récepteurs ER- α soient responsables des rôles liés à la reproduction alors que les récepteurs ER- β sont plutôt reliés aux effets non-reproductifs comme l'apprentissage spatial, l'anxiété et probablement la douleur puisqu'ils sont exprimés surtout au niveau du système nerveux central (Mitra et al., 2003; Merchenthaler et al., 2004). L'interaction entre l'estradiol et le GABA, qui est bien connue, jouerait fort probablement un rôle dans la douleur (Das & Chaudhuri, 1995). En effet, l'estradiol augmente l'activité de la décarboxylase de l'acide glutamique, ce qui induit une relâche de GABA et une augmentation des récepteurs GABA. Au niveau des nocicepteurs, les hormones sexuelles augmentent la sensibilité des fibres afférentes primaires via une induction par les estrogènes de l'expression de trkA, un récepteur connu pour sensibiliser ces fibres (Sohrabji et al., 1994).

6.5 Progestérone

Les récepteurs de la progestérone (PR) se retrouvent également dans les régions du SNC impliquées dans les processus de douleur comme le tractus solitaire et la moëlle ventrolatérale (Kastrup et al., 1999). Au niveau du système nerveux, la progestérone affecte également les fonctions neuronales en modulant la transcription des gènes et l'activité cellulaire via les récepteurs intracellulaires classiques qui sont abondants dans le SNC (Pierson et al., 2005; Mani, 2006). De plus, la progestérone et deux de ses métabolites, l'allopregnanolone et le pregnanolone, peuvent se lier à une variété de récepteurs intracellulaires, en particulier aux récepteurs gabaergiques (Majewska et al., 1986; Paul & Purdy, 1992; Lambert et al., 2003; Pierson et al., 2005). Il semble également que la concentration d'estrogènes puisse moduler l'expression des récepteurs de la progestérone dans certaines régions du cerveau (MacLusky & McEwen, 1978). En effet, PR est un gène cible de l'activité transcriptionnelle des récepteurs estrogéniques. Donc, l'activation par les estrogènes des récepteurs estrogéniques induit l'expression de PR dans la même cellule (Temple & Wray, 2005).

6.6 Androgènes

Les androgènes sont composés de plusieurs molécules, dont les principales sont la testostérone et la dihydrotestostérone (DHT) agissant via les récepteurs androgéniques (AR). Les AR sont largement distribués dans toutes les régions du SNC, dont les régions impliquées dans la douleur, comme l'hippocampe et l'amygdale (Roselli et al., 1997; Aloisi, 2003; Craft et al., 2004). Dans le SNC, l'enzyme aromatasase permet la conversion d'une partie de la testostérone en estrogènes, qui peut par la suite se lier aux récepteurs ER. Cette conversion en estrogène contribue au fait que certains effets de la testostérone dans le SNC ne soient pas médiés via les récepteurs de la testostérone, mais plutôt par ceux des estrogènes. De plus, les estrogènes produites suite à cette transformation peuvent aussi agir tel que décrit précédemment par un effet non-génomique (Horvath & Wikler, 1999; Evrard & Balthazart, 2004).

7. Implication des hormones sexuelles dans la douleur chez l'animal

Il sera maintenant question de l'implication des hormones sexuelles dans les différents types de douleur et dans l'analgésie chez l'animal.

7.1 Douleur aiguë et tonique

De nombreuses études ont été faites chez les animaux afin de vérifier l'implication et le rôle des hormones sexuelles dans les douleurs aiguës et toniques. Beaucoup de ces études utilisent le test à la formaline puisqu'il sert à la fois de modèle pour ces deux types de douleur. Dans ce test, une petite quantité de formaline est injectée dans la patte arrière de l'animal. Les comportements douloureux de l'animal sont ensuite observés pour une période d'une heure et évalués selon quatre stades de comportements douloureux. La moyenne des stades de douleur est calculée pour chaque bloc de trois minutes. Les neuf premières minutes du test équivalent à une douleur aiguë causée par une activation directe des fibres A δ et C. Une phase d'inhibition active de la douleur, l'interphase, est ensuite observée durant laquelle la douleur diminue de façon importante pendant quelques minutes. Finalement, la troisième phase du test correspond à une douleur tonique causée par l'inflammation. Une étude de notre laboratoire chez des rats des deux sexes a démontré que les rats femelles avaient plus de comportements nociceptifs que les rats mâles durant ce test (Gaumond et al., 2002). En supposant que les hormones sexuelles soient responsables de ce phénomène, cette différence inter-genre ne devrait donc pas s'observer chez des rats gonadectomisés sans hormones sexuelles. C'est exactement le résultat documenté dans cette étude. En effet, aucune différence significative n'est observée entre le niveau de douleur des mâles et des femelles gonadectomisés. Les animaux sans hormones sexuelles ont donc un niveau de nociception comparable démontrant ainsi l'implication des hormones sexuelles dans la douleur. Afin de vérifier le rôle facilitateur ou inhibiteur des estrogènes, de la progestérone et de la testostérone, les animaux sains et les animaux gonadectomisés de même sexe ont été comparés. Selon cette même étude, les mâles castrés ont plus de comportement nociceptif que les mâles sains dans toutes les phases du test excepté lors de l'interphase, démontrant ainsi le rôle protecteur de la testostérone contre la douleur

aiguë et tonique. Pour ce qui est des femelles saines et ovariectomisées, elles ont des niveaux de nociception comparables, excepté lors de l'interphase où les femelles ovariectomisées ont moins de comportements nociceptifs que les femelles saines suggérant que les mécanismes d'inhibition sont recrutés plus efficacement en absence d'estrogènes et de progestérone. Suite à ces résultats, la même équipe a voulu isoler l'effet de chaque hormone lors du test à la formaline en supplémentant des animaux gonadectomisés avec des agonistes des hormones sexuelles (Gaumond et al., 2005). En n'injectant que la progestérone, aucune différence au niveau de la nociception n'était observée. Par contre, les femelles ovariectomisées recevant des estrogènes présentaient moins de nociception que les femelles ovariectomisées suggérant un rôle protecteur des estrogènes. Il faut injecter la combinaison de ces deux hormones pour que les femelles retrouvent le niveau basal de nociception, donc pour que les mécanismes d'inhibition soient comparables aux femelles saines. Toutefois, une étude a vérifié le rôle des métabolites de la progestérone dans le test à la formaline chez le rat et est parvenue à démontrer que la progestérone à elle-seule pouvait moduler la douleur (Ocvirk et al., 2008). En effet, quatre des métabolites ont diminué de façon significative la douleur lors de la phase 2 correspondant à la douleur tonique. De plus cette, même étude a démontré que cet effet serait médié via les récepteurs GABA (Ocvirk et al., 2008).

7.2 Douleur chronique

De nombreuses études ont été réalisées pour démontrer le rôle des hormones sexuelles dans les douleurs chroniques. Tout d'abord, dans une étude de Lacroix-Fralish sur un modèle de lombalgie chronique chez des rats, il a été démontré que les femelles saines ont plus d'hyperalgésie avant et après la lombalgie que les femelles ovariectomisées. Pour vérifier quelles étaient les hormones sexuelles responsables de ce phénomène, le même test a été refait chez des femelles ovariectomisées recevant une supplémentation en estrogène, progestérone ou une combinaison des deux. Les femelles réplétées avec de l'estrogène et celle avec la combinaison hormonale avaient un niveau de nociception comparable entre elles. Par contre, les femelles réplétées en progestérone avaient un niveau de nociception plus élevé que les autres groupes, suggérant que ce serait la progestérone qui aurait des effets hyperalgésiques (Lacroix-Fralish et al., 2006).

La testostérone aurait un effet protecteur dans la douleur et l'analgésie dans les deux sexes chez l'animal (Gaumond et al., 2002; Ceccarelli et al., 2003; Aloisi et al., 2003; Aloisi et al., 2004; Gaumond et al., 2005;). Une étude faite par l'équipe d'Aloisi afin de démontrer le rôle de la testostérone chez des mâles a été réalisée en simulant une douleur chronique à l'aide d'une répétition de tests à la formaline. Cette étude a démontré que suite à trois tests à la formaline, les mâles sains montrent une diminution de douleur lors du deuxième et troisième test contrairement aux mâles castrés qui ont un niveau de nociception comparable lors de la répétition du test à la formaline à trois reprises (Aloisi et al., 2003). La testostérone aiderait donc à l'habituation à la douleur et pourrait contribuer à prévenir la sensibilisation centrale responsable de la chronicisation, ce qui pourrait expliquer la plus faible prévalence des douleurs chroniques chez les hommes. Cette observation pourrait s'expliquer par le fait que lors de la castration, la testostérone diminue et les estrogènes augmentent en compensation (Aloisi et al., 2003). L'action protectrice des androgènes dans les douleurs chroniques et l'inflammation a également été démontrée dans plusieurs études. Par exemple, l'administration de testostérone renverserait la réponse immune aux réactions inflammatoires induites expérimentalement chez des rats mâles et femelles gonadectomisés (Steward & Bayley, 1992; Lahita, 1996; Dickenson et al., 1997; Gaillard & Spinedi, 1998). De plus, l'utilisation d'une thérapie de remplacement aux androgènes a été bénéfique chez des patients souffrant d'arthrite rhumatoïde (Cutolo et al., 1991; Bijlsma, 1999).

7.3 Douleur neuropathique

La même tendance concernant le rôle des hormones sexuelles dans la douleur est observée dans les études sur la douleur neuropathique. Tout d'abord, il a été démontré que les femelles développent deux fois plus d'allodynie que les mâles suite à une ligation partielle du nerf sciatique, et que les femelles saines seraient plus susceptibles de développer de l'allodynie que les femelles ovariectomisées (Coyle et al., 1995; Coyle et al., 1996). Ces observations suggèrent donc que les estrogènes et/ou la progestérone contribueraient à augmenter la douleur neuropathique. Par contre, dans ces deux études aucune différence significative n'était observée concernant l'hyperalgésie. Le fait que

l'hyperalgésie thermique et l'allodynie tactile soient différemment affectés par les hormones sexuelles supporte l'hypothèse que ces manifestations de douleur neuropathique impliquent des mécanismes distincts. Cependant, une étude soutient une conclusion inverse en montrant que les rats avec une lésion du nerf sciatique et recevant un traitement à l'estradiol auraient un niveau d'autotomie plus bas que ceux n'en recevant pas. L'estradiol diminue donc la douleur neuropathique dans ce cas-ci (Tsao et al., 1999). Cette même équipe a publié les résultats d'une expérimentation similaire chez des mâles sains et castrés. Selon cette étude, les mâles castrés développent l'autotomie plus rapidement que les mâles sains, soit après 10 jours versus 20 jours, et ont un niveau d'autotomie plus élevé (Lin et al., 2002). Finalement, selon une autre étude, la progestérone contribuerait à la douleur neuropathique chez la femelle. En injectant de façon intrathécale un antagoniste compétitif des récepteurs des estrogènes et de la progestérone, l'allodynie et l'hyperalgésie étaient inhibées de façon dépendante de la dose. En voulant isoler l'implication des récepteurs des estrogènes de ceux récepteurs de la progestérone à l'aide d'antagonistes, les chercheurs se sont aperçus que l'effet pronociceptif des hormones sexuelles femelles passait par les récepteurs de la progestérone (Kondo et al., 2006). Malgré les nombreuses études sur le sujet, il semble que les rôles des estrogènes et de la progestérone dans la douleur ne soient pas encore clairement définis. Des divergences sont observées alors que les estrogènes et la progestérone peuvent avoir un effet parfois pro-nociceptif et parfois anti-nociceptif. Les différents modèles animaux et la grande variété de tests utilisés peuvent expliquer ces différences.

7.4 Analgésie

Puisqu'il est bien démontré que les hormones sexuelles ont un rôle à jouer dans la modulation et la perception de la douleur, il est logique de s'imaginer qu'elles peuvent également être responsables de la différence dans la réponse aux traitements analgésiques. En effet, les études sur ce sujet ont démontré une différence entre les mâles et les femelles au niveau de l'analgésie, tant au niveau de l'analgésie induite par différentes drogues que l'analgésie induite par divers facteurs environnementaux tel le stress (Mogil et al., 2000; Craft, 2003a). Par exemple, chez les rongeurs, les opioïdes

seraient plus efficaces chez les mâles que chez la femelle, alors que la tendance est inversée chez l'humain (Kest et al., 2000; Craft, 2003b). De plus, l'analgésie induite par le stress causée par une nage forcée ou une contention est plus grande chez les mâles que chez les femelles dans la plupart des cas (Romero & Bodnar, 1986; Romero et al., 1987; Mogil et al., 1993; Kavaliers & Galea, 1995). Cette même analgésie serait plus grande chez des mâles sains que chez des mâles castrés et il est également possible de réinstaurer cette analgésie en supplémentant les mâles castrés avec de la testostérone (Romero et al., 1987; Romero et al., 1988; Mogil et al., 1993). Les hormones sexuelles auraient donc un rôle à jouer tant au niveau de la sensibilité des drogues analgésiques qu'au niveau des stimuli qui entraînent des changements neurobiologiques de la perception de la douleur. L'analgésie induite par le stress activerait des systèmes nociceptifs différents chez le mâle et la femelle et cette différence inter-genre serait dépendante des hormones sexuelles. Il est bien connu que l'analgésie induite par la nage forcée est due à des mécanismes d'inhibition à la fois opioïdiques et non opioïdiques (Romero & Bodnar, 1986; Lipa & Kavaliers, 1990). De plus, une étude de notre laboratoire a démontré que la phase d'inhibition active de la douleur lors du test à la formaline n'impliquerait pas les mêmes mécanismes et molécules chez le mâle et la femelle. En effet, chez la femelle, l'interphase a pu être bloquée par de la naloxone, démontrant ainsi que ce mécanisme d'inhibition est majoritairement opioïdique (Gaumond et al., 2006). Chez le mâle, l'interphase n'a pu être bloquée qu'en majorité par un antagoniste GABAergique, la bicuculline, et très peu par la naloxone, ce qui montre bien que les mécanismes impliqués sont différents (Spooner, données non-publiées). Une autre étude sur l'analgésie induite par la nage forcée a montré que cette analgésie peut être abolie par un antagoniste des récepteurs NMDA chez des mâles sains et des femelles ovariectomisées, mais pas chez des femelles saines (Mogil et al., 1993; Kavaliers et al., 1997). Différents mécanismes seraient donc impliqués dans l'analgésie et ceux-ci varieraient entre les mâles et les femelles et selon la présence des hormones sexuelles.

Bref, de plus en plus d'évidences attestent de l'implication des hormones sexuelles dans la douleur et l'analgésie tant chez l'humain que chez l'animal. En résumant

grossièrement, il semble que la testostérone joue un rôle protecteur, alors que les estrogènes et la progestérone auraient plutôt un effet pronociceptif.

8. Interactions entre hormones sexuelles et cellules gliales

Dans les sections précédentes, il a été question de l'implication des hormones sexuelles et des cellules gliales dans la douleur. Dans cette section, l'inter-relation entre ces deux facteurs sera maintenant étudiée. Tout d'abord, par rapport aux estrogènes, il a été démontré que l'administration d'estradiol dans une culture cellulaire de cellules gliales cause une augmentation de l'expression de GFAP, un marqueur de l'activation des cellules gliales (Stone et al., 1998). Par contre, plusieurs jours de remplacement en estradiol suppriment l'activation de la glie au niveau du cerveau chez des rat mâles et femelles (Garcia-Estrada et al., 1993; Del et al., 1995). Des études réalisées sur le cycle menstruel des rongeurs ont démontré que lors de la phase proestrus, qui correspond à la plus forte concentration en estrogènes et en progestérone, une augmentation de l'expression de GFAP est observée (Gould et al., 1990; Brake et al., 2001; Levin-Allerhand et al., 2001; McEwen, 2002;). Finalement, dans un modèle d'accident vasculaire cérébral chez des mâles, une étude a démontré que les mâles castrés ont une augmentation de l'expression de GFAP du côté ipsilatéral qui est beaucoup plus importante que celle observée chez les mâles avec testostérone (Pan et al., 2005).

Les hormones sexuelles peuvent moduler l'action des cellules gliales de plusieurs façons. Tout d'abord, les cellules gliales expriment des récepteurs des hormones sexuelles, rendant possible l'action directe des hormones sexuelles sur les astrocytes en augmentant la régénération axonale des neurones adjacents (Azcoitia et al., 1999). Ensuite, les propriétés anti-oxydantes de l'estradiol sont reconnues et auraient pour effet de supprimer le stress oxydatif sur les neurones (Culmsee et al., 1998; Behl & Manthey, 2000). Finalement, l'estradiol augmente la croissance neuronale via la stimulation de la production d'apoE, produite en partie par les cellules gliales, qui stimule la croissance neuronale (McAsey et al., 2006; Struble et al., 2007). La testostérone aurait également un effet stimulateur sur la régénération axonale et la neurogénèse en empêchant la formation de la barrière de glie qui se forme autour des neurones et qui empêche ainsi la

régénération axonale (Matsumoto, 2001). À l'inverse, il est possible que les cellules gliales modulent également l'expression des hormones sexuelles. Par exemple, lors d'un stress, l'expression de l'aromatase, l'enzyme qui convertit la testostérone en estrogène, est augmentée par les astrocytes (Liu et al., 2007).

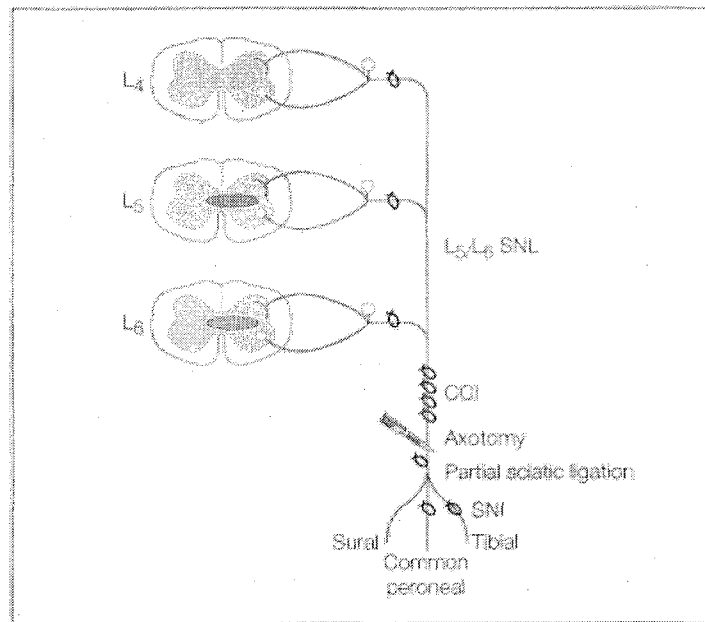
9. Modèles animaux et tests de douleur

De nombreux modèles animaux ont été développés dans les vingt dernières années afin de recréer une douleur neuropathique semblable à celle retrouvée chez l'humain. La plupart de ces modèles animaux reproduisent ce type de douleur en causant des dysfonctions ou des blessures à la moelle épinière ou aux nerfs périphériques. Bien que les tests et les modèles pour douleurs aiguës puissent être utilisés pour étudier les douleurs neuropathiques, celles-ci ont leur propres tests comportementaux et paramètres pour l'évaluer. Comme l'évaluation directe de la douleur spontanée ne peut être faite chez l'animal, certains comportements sont observés afin d'évaluer la présence de douleur spontanée, tels le maintien de la patte près du corps, des morsures, du toilettage excessif et de l'autotomie (Zimmermann, 2001). Pour ce qui est de la douleur évoquée, soit l'allodynie et l'hyperalgésie, celle-ci est facilement observable chez les animaux avec douleur neuropathique.

Parmi les modèles expérimentaux recréant une douleur neuropathique périphérique, les cinq illustrés à la figure 7 sont fréquemment utilisés et sont parmi les mieux caractérisés qui sont illustrés à la figure 7. Le premier modèle développé fut l'axotomie qui consiste en une lésion complète du nerf sciatique. Ce modèle est cependant de moins en moins utilisé, car le nerf sciatique étant complètement sectionné, la patte devient insensible et il est alors impossible de mesurer la douleur évoquée au niveau de cette patte (Wall et al., 1979). La constriction chronique du nerf sciatique (CCI), le deuxième modèle développé, consiste à faire des ligatures lâches autour du nerf sciatique. Ce modèle sera revu plus en détail étant donné qu'il est le modèle utilisé dans ce projet (Bennett & Xie, 1988). La ligation partielle du nerf sciatique (PSL) consiste à faire une ligature serrée autour des deux tiers ou de la moitié du nerf sciatique (Seltzer et al., 1990). La ligation du nerf spinal (SNL) consiste à faire une ligation autour du nerf spinal des lombaires L5-L6, ce

qui représente environ la moitié des afférences du nerf sciatique (Kim & Chung, 1992). Le modèle du « spared nerve injury » (SNI), comporte deux ligatures sur deux des trois branches distales du nerf sciatique, soit le nerf commun péronéal et le tibial (Decosterd & Woolf, 2000). Finalement, le modèle le plus récent consiste à faire une constriction chronique du nerf saphène (Walczak et al., 2006).

Figure 7 : Les principaux modèles animaux de douleur neuropathique



Les principaux modèles animaux de douleur neuropathique sont représentés sur ce schéma. Ces modèles consistent à causer une lésion directement au niveau du nerf sciatique ou aux efférences de ce nerf.

Source : adapté de Wall and Melzack's Textbook of pain, *Mechanisms of experimental neuropathic pain: integration from animal models*, ch 59, 5th edition

9.1 Constriction chronique du nerf sciatique (Modèle de Bennett ou CCI)

La constriction chronique du nerf sciatique est un modèle couramment utilisé afin de recréer une douleur neuropathique périphérique chez l'animal. La douleur créée est provoquée par une dénervation partielle du nerf sciatique qui affecte principalement les neurones afférents myélinisés alors que les neurones amyélinisés demeurent pour la

plupart intacts (Munger et al., 1992). Il est ensuite possible d'analyser les comportements en stimulant la cible du nerf affecté, soit la patte arrière de l'animal. Ce modèle permet de détecter à la fois la douleur neuropathique évoquée et spontanée, car quelques fibres afférentes du nerf sciatique survivent après la chirurgie. Dans les 24 heures suivant les ligatures, il se produit un développement d'œdème intraneural causé par la constriction partielle de la vascularisation due aux ligatures. L'œdème et l'ischémie causées vont également contribuer au développement des lésions des nerfs. Ce sont ces effets qui vont être responsables de la douleur neuropathique plutôt que la ligature elle-même. Les premiers signes de douleur sont observables dans les 24 heures suivant la chirurgie. À l'examen physique, une ventroflexion de la patte arrière de l'animal, une perte d'espace entre les orteils et une éversion de la patte sont observées. Au niveau comportemental, les rats montrent des signes de douleur spontanée comme une protection de la patte lésée et un boitement et évitent de placer le poids sur la patte blessée. Les signes de douleur évoquée, l'hyperalgésie et l'allodynie, sont aussi facilement détectables à partir des 24 heures suivant la ligation et vont persister au-delà de deux mois. (Bennett & Xie, 1988; Attal et al., 1990)

Dans les deux à quatre jours suivant la constriction chronique du nerf sciatique, il se développe une œdème de l'axone et de larges granulomes renfermant des neutrophiles et des macrophages entourent les fils de suture de type « chromic gut » ayant servi aux ligatures. Il a été démontré que les sels chromiques de ce type de fil sont responsables de la production d'inflammation due à la constriction chronique du nerf sciatique et de l'hyperalgésie thermique. (Maves et al., 1993; Clatworthy et al., 1995) L'inflammation et la réponse immunologique qui s'ensuivent sont cruciales pour le développement de la douleur neuropathique suivant l'induction d'une blessure du nerf périphérique. Cette hypothèse est renforcée par le fait que ces effets comportementaux sont réversibles suites à l'administration de dexaméthasone, un glucocorticoïde à action anti-inflammatoire (Clatworthy et al., 1995).

9.1.1 Avantages et inconvénients du modèle de Bennett

Un des principaux avantages du modèle de Bennett est qu'il est celui qui produit les réponses les plus significatives à l'ensemble des tests comportementaux effectués, en plus d'être très facile à produire et peu invasif (Dowdall et al., 2005). Le modèle de Bennett a pour avantage de ne pas causer, ou très peu, d'autotomie ce qui est également un avantage du point de vue éthique. De plus, il est possible d'aller vérifier l'effet des ligatures directement au niveau de la cible du nerf, soit la patte arrière. Finalement, c'est un modèle très utilisé et très bien caractérisé dans la littérature puisqu'il a fait l'objet de plusieurs études (Bennett & Xie, 1988; Dougherty et al., 1992; Kim et al., 1997; Dowdall et al., 2005).

Par contre, le principal inconvénient de cette méthode est le degré de variabilité de la lésion causée au nerf sciatique étant donné qu'il n'est pas possible de contrôler complètement la tension des ligatures. Cela a pour effet d'altérer le niveau d'œdème intraneural et la démyélinisation, et donc de modifier les comportements douloureux associés à la douleur neuropathique. Cette technique cause également des lésions aux neurones moteurs qui innervent les muscles de la patte arrière de l'animal. De plus, il est impossible de contrôler le type des fibres nerveuses qui sont endommagées par cette procédure et donc de discerner la contribution des fibres atteintes par rapport aux fibres intactes dans le développement de la douleur neuropathique.

9.2 Tests de douleur expérimentale

Pour évaluer la douleur neuropathique, l'hyperalgésie et l'allodynie sont les paramètres les plus utilisés puisque ce sont les deux éléments caractérisant ce type de douleur. L'hyperalgésie thermique et l'allodynie mécanique étant généralement bien représentées par le modèle de Bennett, ce sont ces modalités qui ont été étudiés dans ce projet de recherche.

9.2.1 Test de von Frey

Pour évaluer l'allodynie mécanique, le test de von Frey est utilisé. Il s'agit d'un filament à bout arrondi qui est placé sous la patte de l'animal. Le filament exerce une pression

constante allant jusqu'à 4 g dans le cas d'une souris. L'animal retire sa patte lorsque la pression devient douloureuse et le seuil de retrait en grammes est noté. Comme il s'agit d'un test pour vérifier l'allodynie, un animal sans douleur neuropathique ne devrait pas répondre à ce test et donc ne devrait pas retirer sa patte à un seuil de 4 grammes, puisque cette stimulation n'est pas douloureuse en temps normal. Plus le seuil de retrait est bas, plus le seuil de nociception de l'animal est bas.

9.2.2 Test de Hargreaves

Pour évaluer l'hyperalgésie thermique, le test de Hargreaves (ou Plantar test) est utilisé (Hargreaves et al., 1988). Il s'agit d'une source lumineuse produisant une chaleur radiante sous le dessous de la patte de l'animal. Cette source lumineuse exerce une chaleur dont la température avoisine les 50°C. L'animal retire sa patte lorsque la chaleur exercée devient trop grande. Cette stimulation est douloureuse chez des animaux sains également. Moins le temps de latence de l'animal est long, plus le seuil de nociception de celui-ci est bas.

9.2.3 Analgésie induite par la nage forcée

Le test de la nage forcée consiste à placer l'animal dans un contenant rempli d'eau et de le laisser nager. Pour l'animal, le fait d'être placé dans un bac d'eau va causer un très grand stress qui va engendrer une analgésie. Il est possible de modifier le type d'analgésie créé par la nage forcée, soit opioïdérique, non-opioïdérique ou une combinaison des deux, en variant la température de l'eau et la durée de la nage. Comme nous voulions recréer une analgésie opioïdérique semblable à celle causée par les CIDN, nous avons choisi de faire ce test à une température de 32°C pendant trois minutes. En effet, Mogil a démontré qu'à ces paramètres l'analgésie obtenue pouvait être bloqué complètement avec la naloxone, démontrant ainsi qu'elle était opioïdérique (Mogil et al., 1996).

Objectifs de l'étude

Ce projet de maîtrise est divisé en deux parties, soit comportementale et fondamentale :

- 1- Déterminer le rôle du genre et l'effet du retrait des hormones sexuelles dans un modèle murin de douleur neuropathique.

De nombreuses études ont déjà démontré que les hormones sexuelles avaient un impact majeur sur la modulation de la douleur, que ce soit au niveau des mécanismes excitateurs ou inhibiteurs. Cependant, la majorité de ces études ont démontré ce phénomène à l'aide de modèles animaux de douleurs aiguës, toniques et chroniques. Nous avons donc voulu vérifier quelle était l'importance de l'implication des hormones sexuelles dans un modèle de douleur neuropathique. Plus spécifiquement, nous avons vérifié si :

- le genre et le retrait des hormones sexuelles modulent les deux caractéristiques principales de la douleur neuropathique, soit l'allodynie et l'hyperalgésie.
 - le genre et le retrait des hormones sexuelles ont un effet dans les mécanismes d'inhibition de la douleur, comme l'analgésie induite par le stress.
- 2- Confirmer l'implication des cellules gliales dans la douleur neuropathique suite à une lésion d'un nerf périphérique et vérifier la relation entre la présence ou le retrait des hormones sexuelles et l'activation des cellules gliales dans la douleur neuropathique.

Il est bien documenté que les cellules gliales sont impliquées dans les douleurs chroniques. Nous avons voulu vérifier si les hormones sexuelles modulaient l'activation des cellules gliales dans la douleur neuropathique.

Hypothèses de recherche

- 1- Puisqu'il est bien connu que les hormones sexuelles jouent un rôle important dans la douleur, les hormones sexuelles devraient également moduler la perception et les processus de modulation dans la douleur neuropathique. De plus, les hormones sexuelles devraient également influencer les mécanismes d'inhibition de la douleur.

- 2- Puisqu'il a été démontré que les cellules gliales sont impliquées dans la douleur chronique, l'activation des cellules gliales devrait être augmentée suite à une lésion à un nerf périphérique. Finalement, la présence des hormones sexuelles devrait influencer l'activation des cellules gliales.

Avant-propos

Effects of gender, sex-hormones deprivation and glial cells activation on a mice model of neuropathic pain

Patricia Robichaud, Julie C. Carrier, MD. and Serge Marchand, Ph.D.

Article scientifique soumis à la revue *Neuroscience* (Décembre 2008)

Apport original de l'étudiante à l'article présenté

En collaboration avec mes directeurs de recherche, Dr. Serge Marchand et Dre. Julie Carrier, j'ai participé à l'élaboration du projet de recherche et des méthodes nécessaires pour obtenir les résultats désirés. De plus, j'ai réalisé toutes les étapes des expérimentations et j'ai effectué la compilation, l'analyse statistique ainsi que l'interprétation des résultats. Pour ce qui est de ma contribution à l'article, j'ai fourni tous les résultats présentés et j'ai effectué l'écriture complète du manuscrit.

Résumé de l'article

INTRODUCTION: Il est maintenant bien établi que les hormones sexuelles jouent un rôle important dans la perception et les processus d'inhibition de la douleur. En effet, de nombreuses études ont démontré qu'il existe des différences entre les mâles et les femelles dans la douleur aiguë, la douleur tonique et dans l'analgésie. La testostérone aurait un rôle protecteur alors que l'estrogène et la progestérone auraient plutôt un rôle pronociceptif. Par contre, le rôle des hormones sexuelles dans la douleur neuropathique reste moins connu. Des études récentes ont également démontré que les cellules gliales contribuent à la douleur chronique, notamment à la douleur neuropathique. Le but de l'étude était de vérifier l'implication des hormones sexuelles et des cellules gliales dans la douleur et l'analgésie à l'aide d'un modèle animal de douleur neuropathique.

MÉTHODE: Pour recréer une douleur neuropathique, des souris mâles et femelles avec ou sans leurs hormones sexuelles ont subi une constriction chronique du nerf sciatique. Les souris ont été testées durant une période de 28 jours pour deux composantes de la douleur neuropathique, soit l'allodynie avec le test de von Frey et l'hyperalgésie avec le test de Hargreaves. Pour étudier le rôle des hormones sexuelles dans les mécanismes d'inhibition de la douleur, le test de la nage forcée a été utilisé. Pour vérifier l'implication des cellules gliales, des coupes de moëlle ont été prélevées chez les souris au vingt-huitième jour et une analyse immunohistochimique a été effectuée à l'aide d'un marqueur des cellules gliales, le GFAP.

RÉSULTATS: En général, les mâles ont moins de douleur que les femelles et ce autant pour l'allodynie que l'hyperalgésie. Alors que les femelles avec et sans hormones sexuelles ont un niveau d'allodynie comparable, les mâles castrés ont pour leur part un niveau d'allodynie et d'hyperalgésie plus élevé que les mâles avec testostérone. Les animaux avec hormones sexuelles semblent avoir une meilleure analgésie puisque les femelles et les mâles ont moins de nociception après la nage forcée que les femelles ovariectomisées et les mâles castrés, respectivement. L'analyse immunohistochimique a confirmé que chez les animaux ayant eu une lésion au nerf périphérique, l'activation des cellules gliales était très évidente avec une induction encore plus marquée du côté de la lésion. Chez les animaux sans douleur neuropathique, un léger marquage était observé, indiquant la présence de cellules gliales non-activées. Cependant, tous les groupes, indépendamment de leur statut hormonal, avaient une densité spinale comparable de cellules gliales.

CONCLUSION: Les résultats obtenus dans cette étude démontrent que les hormones sexuelles sont impliquées dans les mécanismes de modulation de la douleur neuropathique tant chez le mâle que chez la femelle. De plus, les résultats ont démontré les cellules gliales sont activées suite à l'insulte neuronale responsable de créer la douleur neuropathique. Par contre, la contribution des cellules gliales dans ce type de douleur ne semble pas être influencée par les hormones sexuelles.

Article

Effect of gender, sex-hormones deprivation and glial cell activation on a mice model of neuropathic pain

Patricia Robichaud¹, Julie C. Carrier² and Serge Marchand¹

¹Département de neurochirurgie
Faculté de Médecine et des sciences de la santé
Université de Sherbrooke
Sherbrooke, Québec, Canada
J1H 5N4

²Département de médecine et département d'anatomie et biologie cellulaire
Faculté de Médecine et des sciences de la santé
Université de Sherbrooke
Sherbrooke, Québec, Canada
J1H 5N4

Pages: 33
Tables: 0
Figures: 5

Running head: Sex hormones and neuropathic pain

Correspondence to: Serge Marchand, Ph.D.
Université de Sherbrooke
Faculté de médecine
Axe Douleur, CRC-CHUS
3001, 12^e avenue nord
Sherbrooke, Québec, Canada
J1H 5N4

Abbreviations

ANOVA: analyses of variance

CAST: castrated

CCI: chronic constriction injury

CNS: central nervous system

DNIC: diffuse noxious inhibitory control

GFAP: glial fibrillary acidic protein

NGS: normal goat serum

OVX: ovariectomised

PBS: phosphate buffer saline

PWL: paw withdrawal latency

PWT: paw withdrawal threshold

SIA: stress-induced analgesia

Abstract : Differences between males and females in acute and tonic pain are well-established. However, the role of sex hormones in neuropathic pain remains elusive. In the present study, a peripheral nerve injury model (chronic constriction injury, CCI) was used to investigate gender differences in neuropathic pain using intact and gonadectomized mice of both sexes. Mice have been tested for mechanical allodynia (von Frey test) and thermal hyperalgesia (Hargreaves test) for up to 28 days post-CCI. Since we previously demonstrated that endogenous pain inhibitory mechanisms differ between sexes, a stress-induced analgesia test (swim test) was also performed on our group of animals. Since glial cells are known to be involved in the development of neuropathic pain, a marker of activated glial cells, GFAP, was detected in spinal cord. Animals with CCI presented more nociception and a higher density of GFAP than controls. In accordance with previous studies, females display lower pain thresholds than males for both allodynia and hyperalgesia. While the level of nociception did not differ between females and ovariectomized females, castrated males have more pain and for a longer period of time than intact males, suggesting that testosterone plays a protective role in pain. Finally, pain inhibitory mechanisms are recruited more efficiently in intact animals than in gonadectomized animals. Despite higher level of nociception in females and even castrated males, GFAP density was comparable for all groups, suggesting that the activation of glial cells is not mediated by sex hormones. These results provide further evidence that sex hormones influence nociceptive modulations and that glial cells are reactive following neuropathic injury. However, the effects of sex hormone status on neuropathic pain are not likely mediated by glial cells.

Keywords : gonadectomy, stress-induced analgesia, GFAP, allodynia, hyperalgesia, CCI

Introduction

It is well documented that gonadal hormones play significant roles in mediating gender differences not only in pain transmission but also in analgesic processes (Aloisi et al., 2000, 2003; Craft et al., 2004). In experimental studies, women present lower pain and tolerance thresholds and evaluate an equivalent stimulus as being more painful than men (Riley et al., 1998). Moreover, many chronic pain conditions, such as fibromyalgia, affect a significantly higher number of women than men (Berkley, 1997, Yunus, 2002). Results obtained from animal studies concur with those obtained in humans: females present more nociceptive responses than males (Mogil et al., 2000; Gaumond et al., 2002). In addition, endogenous pain inhibitory mechanisms are less effective in females than in males. Female rodents manifest less opioid stress-induced analgesia (SIA) than males after restraint and forced swim (Romero & Bodnar, 1986; Kavaliers & Innes, 1987; Libieskind et al., 1993). Interestingly, female hormones have been reported to specifically affect the inhibitory interphase of the formalin test (Gaumond et al., 2007)

Most of the studies demonstrating gender differences in pain used either acute or inflammatory nociceptive pain models. However, the implication of gonadal hormones in neuropathic pain still remains elusive. Neuropathic pain is a severe chronic pain condition caused by damage or dysfunction of the central or peripheral nervous system. Drugs known to be effective for pain symptoms such as morphine are not generally very effective for neuropathic pain. Mechanisms underlying this type of pain are complex, implicating a sensitization of the central nervous system. The pathophysiology of neuropathic pain caused by a peripheral nerve injury is commonly investigated with the use of the chronic constriction injury (CCI) model (Bennett & Xie, 1988). This nerve

injury results in pathological pain states characterized by thermal hyperalgesia (exaggerated responses to painful heat) and mechanical allodynia (increased sensitivity to a non-noxious stimulus) (Zimmermann, 2001).

Glial cells are abundant in the CNS and this normally quiescent cell population actively influences neuron physiology and synaptic communication, in addition to providing structural support for neurons and blood vessels. Furthermore, evidences suggest that glial cells play complex role in a wide range of CNS pathologies, including trauma, ischaemia, and neurodegeneration (Eng et al., 2000; McTigue & Tripathi, 2008). Recently, there has been mounting interest on the contribution of glial cells activation in pain modulation (Coyle 1998; Watkins et al., 2001). Indeed, spinal cord astrocytes activation is a characteristic response to either neuropathy or transection of a peripheral nerve in several animal models (Colburn et al., 1999; Fu et al., 1999; Zhang et al., 2003). In those, the hallmarks of reactive astrocytoses are hypertrophy, proliferation and upregulation of the intermediate filament glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Garrison et al., 1991; Gomes et al., 1999; Garcia-Segura & McCarthy, 2004). In fact, in neuropathic pain states, enhanced GFAP immunostaining correlates well with nociceptive behavioural response (Watkins et al., 2001; Garrison et al., 1991). In addition, a growing body of evidences support that activated microglia and astrocytes also contribute to the initiation and maintenance of persistent pain states (DeLeo & Yeziarski, 2001; Watkins et al., 2001; Raghavendra & DeLeo, 2003). Moreover, glial activation has been shown to be necessary and sufficient to create pathological pain states in laboratory animals (Meller et al., 1994; Milligan et al., 2001, 2003). Finally, astroglia are affected by steroid hormones by which they play numerous underappreciated roles in nervous system functions. In fact,

it is well known that sex hormones can modify morphology and functions of neurons and glial cells as shown by experimental findings *in vivo* and *in vitro* demonstrating that GFAP immunoreactivity can be modified by gonadal steroid manipulation in different brains areas (Garcia-Segura et al., 1994; Hajos et al., 2000; Conejo et al., 2003; Garcia-Segura & McCarthy, 2004).

The goal of this study was to investigate the role of sex hormones deprivation on neuropathic pain caused by a CCI in mice of both genders. In addition we investigated the consequence of deprivation for those hormones on endogenous inhibitory pain mechanisms. To complement our behavioural results we evaluated the density of GFAP and the effect of gonadectomy on GFAP expression.

Experimental procedures

Animals

Sixty-eight C57/BL6 mice (Charles River, St-Constant, Qc, Canada) of 10 weeks of age at the time of gonadectomies were used. Mice were randomly assigned to one of the eight following groups: females sham CCI (n=7), females CCI (n=10), ovariectomized (OVX) females sham CCI (n=9), OVX CCI (n=11), males sham CCI (n=7), males CCI (n=9), castrated (CAST) males sham CCI (n=8), CAST CCI (n=9). Mice were housed four per cage before the CCI surgery and one per cage after the surgery under a 12-h light/dark cycle. Temperature and relative humidity were maintained constant (22°C, 55%). Food and water were available *ad libitum*. All tests were performed between 09:00 h and 11:00 h to reduce any variation related to circadian cycle. In order to reduce stress, mice were handled daily for the 2 weeks preceding testing. The experimental protocols were approved by The Animal Care and Use Committee at the Université de Sherbrooke.

Gonadectomies

At 10 weeks of age, all animals were anesthetised with isoflurane and randomly assigned to intact or gonadectomized (OVX or CAST) groups. In OVX females, bilateral ovariectomy was performed by removing ovaries following abdominal incisions on each side of the abdomen. For gonadally intact females, ovaries were exteriorized but not removed. In CAST males, castration was performed by removal of the testes following a single 1 cm midscrotal incision, while in gonadally intact males the testes were merely exposed. A period of three weeks separated the gonadectomies and the beginning of testing to allow recuperation from the surgery and elimination of any possible sex

hormones stored in fat. During that period, animals were observed by the animal care facility personnel to ensure their good health.

CCI surgery

The chronic constriction injury (CCI) model of neuropathic pain was used as previously described (Bennett, 1988). Briefly, the animals were anesthetised with isoflurane in an O₂ carrier (5% for induction and 2% for maintenance). Under aseptic conditions, 1 cm skin and muscle incision was made at the mid-thigh level to expose the right sciatic nerve. Three ligatures (chromic gut 6-0, Ethicon) were loosely tied around the sciatic nerve proximal to the trifurcation, at about 0.5 mm spacing, taking care to preserve epineural circulation. The muscle, the adjacent fascia and the skin were closed with sutures (Silk 6-0, Ethicon). Sham operations involved exposure of the right sciatic nerve without ligation.

Behavioral analysis of mechanical allodynia and thermal hyperalgesia

Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia testing were performed in all eight groups. Baseline tests were performed two days before CCI surgery and testing was performed at days 3, 7, 14, 21 and 28 after CCI. Mice were habituated to handling and to the test apparatus the day before and at least 20 min before experiments on testing days.

Mechanical allodynia

Mechanical sensitivity to non-noxious stimuli was assessed by the von Frey test in which paw withdrawal threshold (PWT) to the filaments was measured using a Dynamic Plantar Aesthesiometer (Ugo Basile, Italy). Briefly, animals were placed in plastic cages with a

wire-mesh floor. Increasing mechanical stimulation (cut-off force: 4 g) was applied to the plantar surface of a hind paw until paw withdrawal. Unresponsive mice received the maximal score of 4 g. Each test session consisted of 5 stimulations recorded from both paws at 5 minutes intervals. When a withdrawal response occurred, the stimulus was terminated and the response threshold was electronically recorded. PWT was calculated as the mean of the threshold of the five stimulations.

Thermal hyperalgesia

Thermal hyperalgesia was assessed by the Hargreaves test in which paw withdrawal latency (PWL) to a radiant heat stimulus was measured using a plantar analgesic meter (IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, USA) (Hargreaves 1988). Briefly, the mice were placed in plexiglass cubicles mounted on a glass surface and the heat source was applied to the plantar surface of the hind paw. PWL was defined as the time between the initial exposure of the thermal stimulus and withdrawal of the paw from the glass. Five measures were recorded from each paw at 5 minutes intervals and PWL was determined as the average of five measurements per paw. A cut-off latency of 20 seconds was used to prevent tissue damage. Intensity of the heat stimulus was adjusted so that the baseline PWL in normal mice was 10 sec.

Stress- induced analgesia (swim test)

Baseline nociceptive assessment was measured for mechanical allodynia and thermal hyperalgesia. Immediately following baseline testing, mice were subjected to a 3-min forced swimming in a rectangular plastic container fill with water at $32 \pm 1^\circ\text{C}$. Those parameters were previously demonstrated as creating opioid analgesia (Mogil, 1996). Following removal out of the water, mice were pat dried with towels and PWT and PWL were reassessed. Analgesia was defined as a significant pre-swim versus post-swim

repeated measure. For purposes of group comparisons and illustration, analgesia was expressed as percentage of the maximum possible effect (%MPE), as calculated by the following formula:

$$\%MPE = \frac{(post - swim\ threshold - baseline\ threshold)}{(cut - off\ threshold - baseline\ threshold)} \times 100$$

The use of %MPEs takes account differences in baseline nociceptive latencies so that these differences will not bias the quantification of stress-induced analgesia (SIA). Separate analyses were performed on baseline latencies to determine whether differences existed due to hormonal manipulation.

GFAP immunohistochemistry

At day 28, the animals were deeply anesthetised by the i.p. administration of a mixture of ketamine (87 mg/kg) and xylazine (13 mg/kg) and intracardially perfused with 30 ml of freshly prepared 4% formaldehyde in 0.1M sodium phosphate buffer pH 7.4 (PBS). The spinal cord was dissected, fixed overnight in the same fixative and kept in PBS containing 30% (w/v) sucrose. Transverse L4-L5 spinal cord sections (20 μ m) were cut on a cryostat and floating sections were processed for GFAP immunohistochemistry. Briefly, sections were incubated for 1 h at room temperature (RT) in a 0.5% hydrogen peroxide solution to quench endogenous peroxidase. Following 3 washes with PBS, sections were blocked in 2% BSA (Sigma-Aldrich)/0.3% Triton-X 100/PBS for 1 h at RT. Spinal sections were then incubated with rabbit GFAP polyclonal antibody (1:5000, Sigma-Aldrich) in 2% BSA/0.3% Triton-X 100/PBS overnight at 4°C, washed, incubated in biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:200, Vector Laboratories) secondary antibody in 2% BSA/PBS for 1 h at RT, washed and treated with avidin-biotin reagents (1:100) for 1

h at RT (Vectastain, Vector laboratories). Sections were washed three more times in PBS and immunostaining was revealed by 1% diaminobenzidine-tetrahydrochloride, 0.3% H₂O₂ and 1% nickel chloride in PBS. The reaction was stopped after 2 minutes using five washes of PBS. Sections were mounted onto slides, air-dried, dehydrated through graded ethanol solutions followed by xylene and coverslipped with Permount (Fischer Scientific). To rule out non-specific staining, control sections were incubated in the absence of primary antibodies.

GFAP density measurements

To analyze changes in astrocytes following peripheral nerve injury, five sections were analyzed from both L4 and L5 spinal cord segments from at least four animals of each experimental group. Images were scanned by a light Nikon microscope (10X) linked to a computer. GFAP density in dorsal horn lamina were determined by measuring pixel densities in the laminae I–II and IV–V of the spinal cord segment L4 and L5 using Adobe Photoshop (9.0, Adobe System). For each lamina, GFAP density from L4 and L5 spinal segments were combined to get an average. Alterations in the level of immunoreactivity for GFAP staining were quantified by comparing average intensity of ipsilateral and contralateral gray matter. All quantifications were performed by one evaluator blinded to the experimental group.

Statistical analysis

All behavioral data were analyzed by repeated measures ANOVAs (SPSS 9.0). Time (Days -2, 3, 7, 14, 21, 28) was treated as within-subjects variable. Gender (male vs. female), surgery (sham CCI vs. CCI) and hormonal condition (females sham vs. OVX

and males sham vs. CAST) were treated as between-subjects variables. Four-way analyses of variance (ANOVAs; sex X surgery X hormone X time) were performed on allodynia and hyperalgesia data, while two-way ANOVAs (ANOVAs; hormone X time), conducted separately for males and females, were performed on %MPE data. Significant interactions were followed by simple effects and by Bonferroni post converted pairwise comparisons. For immunohistochemistry, a three-way ANOVA, conducted separately for each laminae group, was used to investigate differences between sex, surgery and hormones. $p < 0.05$ was considered significant. All values are expressed as means \pm S.E.M.

Results

Mechanical allodynia

The chronic constriction injury model is an established model of neuropathic pain characterized by mechanical allodynia reported by a reduction in ipsilateral withdrawal thresholds when compared with baseline values, as shown in Fig.1A. A profound difference was evident in mechanical allodynia between males and females mice subjected to CCI (Fig. 1A). Indeed, from day 14 onwards males and CAST males had higher allodynia threshold than females (all $ps < 0.003$), regardless of hormonal status, suggesting that in general males with and without testosterone recover more quickly than females. While females and OVX mice had comparable levels of mechanical allodynia (all $ps > 0.124$), males and CAST mice significantly differed on days 14, 21 and 28 (all $ps < 0.003$), where males returned to pre-ligation values as early as day 14 (Fig. 1A). Allodynic responses were not elicited in sham CCI animals and values remained constant (4 g) for 28 days (Data not shown).

Thermal hyperalgesia

PWL analyses showed that males had longer latency values than CAST males on day 3 to 28 (all $ps < 0.026$), as shown in Fig.1B. Surprisingly, hypoalgesia, not hyperalgesia, was observed following the CCI surgery in all groups (all $ps > 0.055$). For CCI animals, analyses revealed that females and OVX females had comparable levels of thermal hyperalgesia (all $ps > 0.220$), as illustrated in Fig. 1B. Paw withdrawal latency values remained constant for 28 days in sham CCI animals (Data not shown). No changes were observed in measurement of mechanical allodynia and thermal hyperalgesia from the contralateral side paw or the paws on either side in the sham CCI mice (Data not shown).

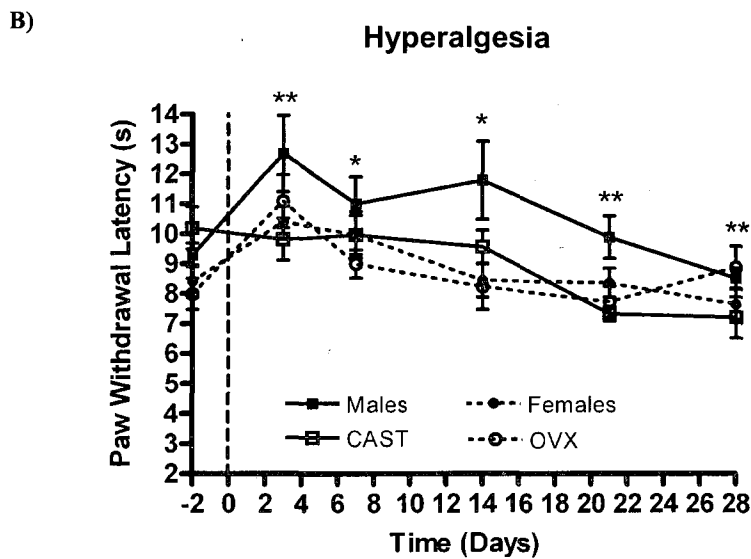
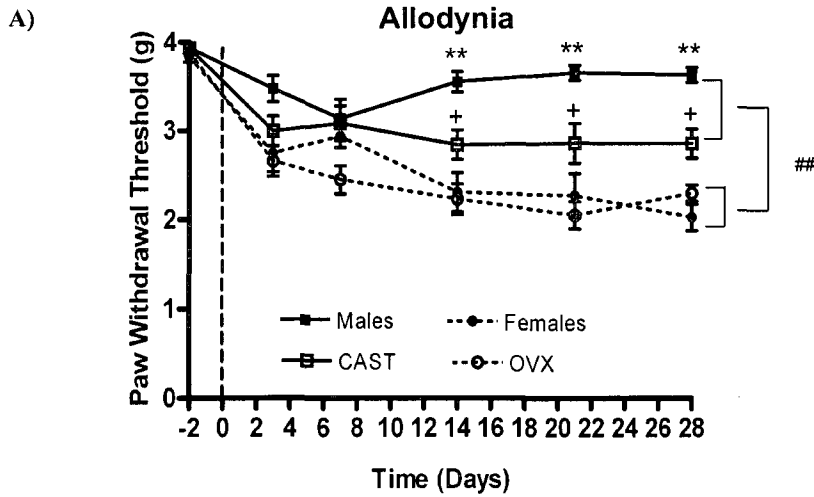


Fig.1. Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in intact and gonadectomized females and males after CCI. A) Mechanical allodynia B) Thermal hyperalgesia. Data shown as means \pm S.E.M. $n=7-11$ mice/group ## $p<0.01$ for the comparison between the two groups of males and the two groups of females, * $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$ when comparing the group under the sign to CAST males, + $p<0.05$ when comparing the group under the sign to OVX females.

Stress-induced analgesia

Fig.2 illustrates the results for swim stress-induced analgesia. Analyses performed on %MPE scores revealed a significant main effect of sex hormones deprivation for females ($p < 0.017$), indicating that females displayed more analgesia than OVX females in allodynia and in thermal hyperalgesia. In males, only the analgesic effect on hyperalgesia is shown since it was not possible to discriminate differences in allodynia as both groups returned to pre-ligation values following the swim-test. A similar pattern of results was observed for males in hyperalgesia where males showed more analgesia than CAST ones (all $ps < 0.063$, except for day 14, $p = 0.893$), suggesting that pain inhibitory mechanisms are recruited more efficiently in intact animals.

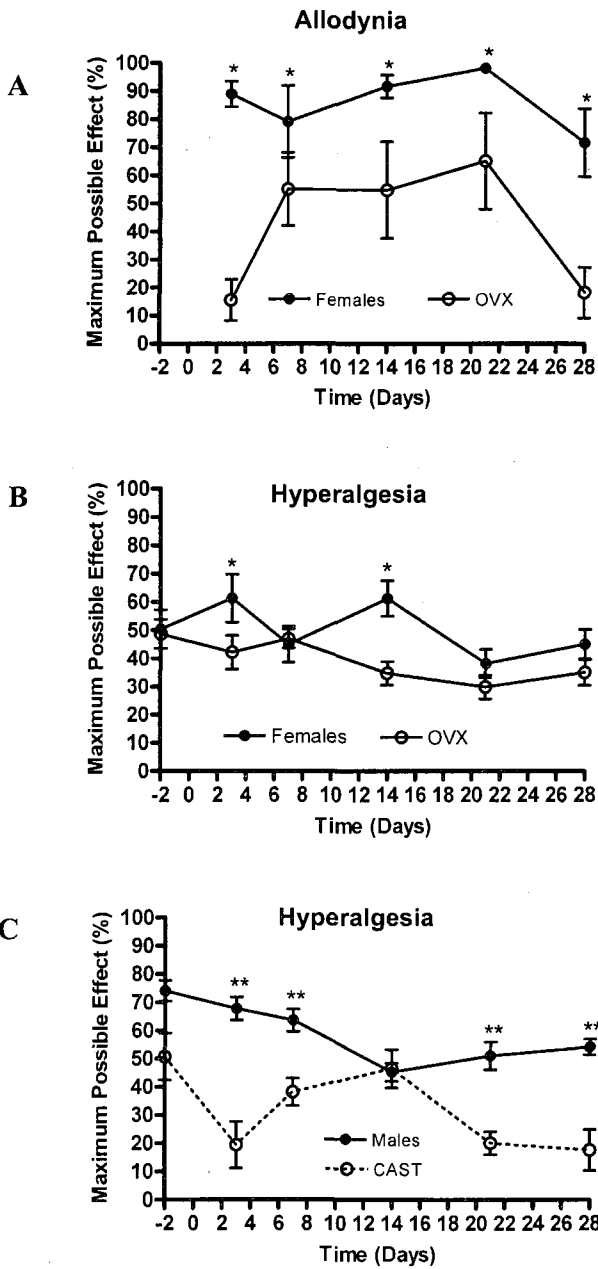


Fig.2. Effects of sex hormones deprivation on stress-induced analgesia in mice with neuropathic pain. A) Females have significantly more analgesia than OVX females in allodynia. B) Females have more analgesia than OVX females in hyperalgesia. C) Males displayed more analgesia than CAST males in hyperalgesia. Analgesia in males for allodynia is not shown due to a return to pre-ligation level in both groups. Analgesia is represented as percentage of maximum possible effect (%MPE). Data shown as means \pm S.E.M. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ when compared to GDX animals.

GFAP density

GFAP density measurement was done in lumbar spinal cord laminae I-II and IV-V ipsilaterally and contralaterally to the CCI surgery. It was clear from subjective observation that there were no lateralized differences in GFAP immunostaining in L4-L5 segments of sham CCI mice (Fig. 3A and 3B) while GFAP was increased in the ipsilateral side of CCI mice (Fig. 3C and 3D). Computer image analyses confirmed these observations revealing significant differences in all CCI groups between the ipsilateral and contralateral side of the dorsal horn in both lamina groups I-II ($p < 0.001$) and IV-V ($p < 0.001$) (Fig. 4B). Computer image analyses also revealed comparable GFAP density between ipsilateral and contralateral sides in sham CCI mice for lamina I-II ($p = 0.13$) and for lamina IV-V ($p = 0.312$) (Fig. 4A).

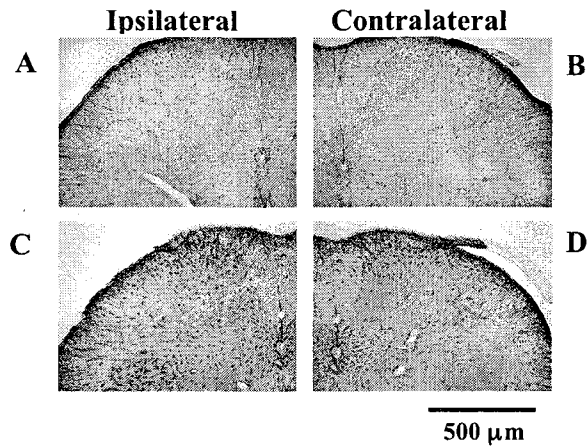


Fig. 3. Photomicrographs of GFAP immunostained transverse sections from L4-L5 spinal cord of male sham CCI and CCI animals at day 28. Panel A and B display respectively the ipsilateral (corresponding to sham ligated side) and contralateral (corresponding to intact side) dorsal horn of a sham CCI animal. No significant difference in GFAP density is observed between both sides. Panel C and D show the dorsal horn of a CCI animal. The ligated side (C) demonstrates an increased density in GFAP staining compared to the contralateral side (D) (magnification 10X, scale bar:500 μm).

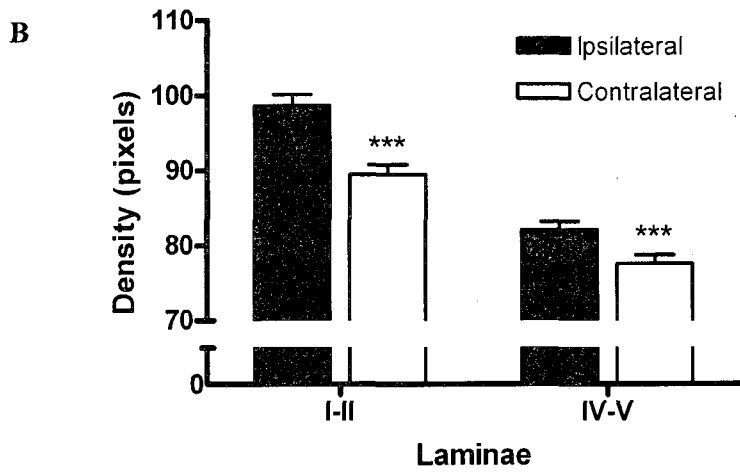
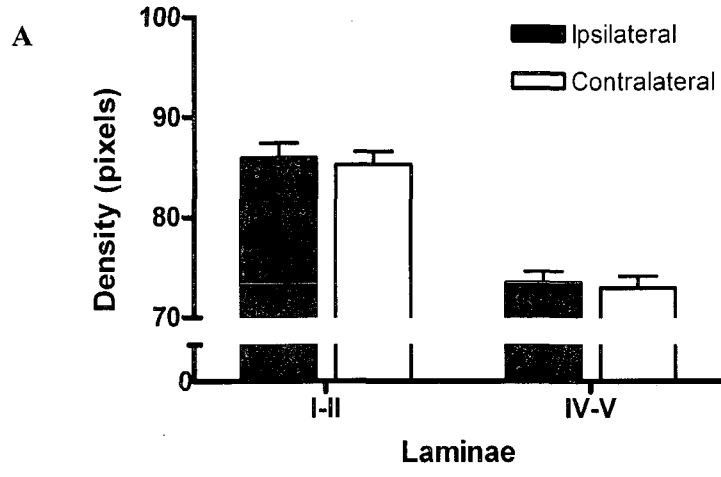


Fig. 4. GFAP density on sham CCI and CCI animals in laminae I-II and IV-V. A) No difference is observed between the ipsilateral and contralateral sides of sham CCI animals in both laminae I-II and IV-V. B) GFAP density is increased in the ipsilateral side of CCI animals compared to the contralateral side in both laminae I-II and IV-V. Data shown as means \pm S.E.M. *** $p < 0.001$ when compared to ipsilateral side.

Effects of sex hormones deprivation on GFAP density

Analyses showed that gender and hormonal status did not moderate the effects of ligation on GFAP density (all $ps>0.05$) as shown in Fig. 5. Therefore, the effects of sex and sex hormones documented above are not likely mediated by differences on astrocytes glial cell functions.

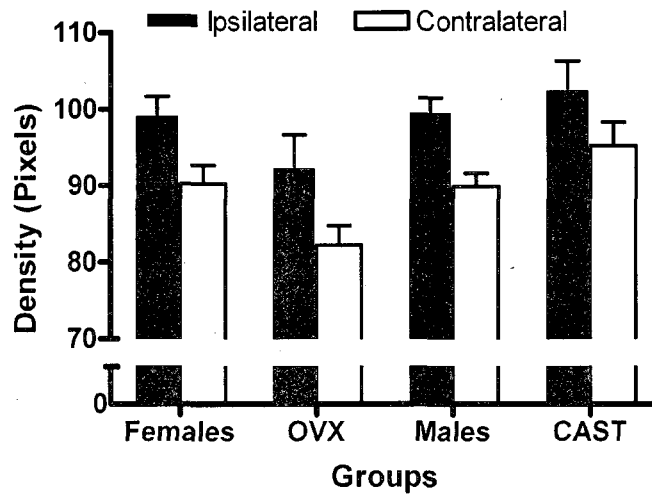


Fig. 5. Effects of gender and sex hormones on the expression of GFAP in CCI mice. GFAP density is comparable between groups in both ipsilateral and contralateral side. Data shown as means \pm S.E.M.

Discussion

We investigated to which extent gender and hormonal status affected thermal hyperalgesia and tactile allodynia following a peripheral nerve injury. In the absence of nerve injury, allodynic responses were not elicited by all of our animals while paw withdrawal latency values remained constant for 28 days. On the opposite, all mice with CCI developed neuropathic pain characterized by a higher level of allodynia following the surgery. From day 14 onward males had less allodynia than females, regardless of hormonal status, suggesting that in general males recover from the neurogenic nociceptive responses while females presented a persistent pain condition up to the end of the testing. Furthermore, gonadally intact males returned to baseline values by post-CCI day 14, while castrated males remained allodynic until day 28. It is interesting to note that this recovery from neuropathic pain and return to baseline level was not detected in intact or ovariectomized females nor was it noted in castrated males. Findings as such suggest that testosterone may reduce the severity of neuropathic pain and help prevent chronicization probably by inhibiting the inflammatory component. In fact, it is well established that the inflammatory and associated immune responses elicited by ligation of the sciatic nerve are crucial for the development of neuropathic pain (Maves et al., 1993; Clatworthy et al., 1995). In addition, previous studies have shown that the enhanced immune response to experimentally induced inflammatory reactions was completely reversed by testosterone administration (Gaillard & Spinedi, 1998). These results support the hypothesis that testosterone may play a protective role in pain by inhibiting inflammation. In the same order of idea, results obtained on our male cohorts can relate to a study where the role of testosterone in male rats was studied in simulating a chronic

pain condition by repetitive formalin tests (Aloisi et al., 2003). In intact males, the response decreased from the first to the third formalin test while in castrated animals no differences were found among the three trials. Those results suggest that the presence of androgens helped the animals to habituate to the nociceptive stimulus whereas this ability was lost in gonadectomized animals. That could be hypothesized by the interesting fact that following castration, testosterone concentration decreased while estrogen concentration increased in compensation (Aloisi et al., 2003). Intact males also have longer latency values than castrated males on day 3 to 28 in hyperalgesia. Surprisingly, our animals did not display a reduction to withdrawal latency to heat and hypoalgesia was rather observed. Possible explanation for that unexpected result may be that following the injury, animals are reluctant to place their weight on the affected hind paw and therefore radiant source may not have heated the affected paw correctly. Consequently, hyperalgesia might have been underestimated. Another possibility resides in the difficulty in testing highly active mice for thermal hyperalgesia, as paw withdrawal latency is longer than for mechanical stimulation, resulting in larger variability. Also, it has been shown that ligations that are too tight can cause a neurological deficit associated with hypoalgesia rather than hyperalgesia. Finally, since Hargreaves test is known to have a large variability, maybe the number of animals per group was not sufficient to detect any changes in the withdrawal latencies. Females had a comparable level of nociception, in both allodynia and hyperalgesia. Those results are in contrast with a previous study where intact females were more susceptible to the development of allodynia than ovariectomized ones (Coyle et al., 1996). This apparent discrepancy could be due to the difference in rodents and pain models used. In fact, it has been demonstrated that gender

differences in rodents is highly dependent on genetic background and differences in pain models, (Mogil et al., 1999; DeLeo & Rutkowski 2000; LaCroix-Fralish et al, 2005). The gender differences observed in the present study could be mediated by organizational and/or activational effects of gonadal hormones. At first, organizational action of steroids mediate developmental sexual dimorphic differentiation of brain morphology, giving rise to adult male and female sexual behavior and physiology. Subsequently, activational action involves the acute effects of gonadal hormones on the fully developed nervous system and is responsible for maintaining male and female sexual and other behaviours in adulthood. In the present study, both organizational and activational effects are in action. Indeed, even after the castration, prior exposure to testosterone can still exert some protective effects as castrated males have less allodynia than ovariectomized females. The activational action of testosterone and other gonadal hormones is supported by higher levels of neuropathic nociception in castrated males compared with males having intact hormonal status. These data support previous findings of sex-related differences in basal nociceptive thresholds in rodents and humans (Aloisi et al., 2003).

Previous studies from our group using the formalin test suggested that female hormones exert their effects mainly on pain inhibition mechanisms, as supported by specific modulation of nociception during the interphase, characterized by active pain inhibition (Gaumond et al., 2005). In neuropathic pain, stress-induced analgesia was determined as a reflection of active endogenous pain inhibition. As expected, intact females displayed more analgesia than ovariectomized females for both allodynia and hyperalgesia. This is also in line with our recent study on the role of sex hormones on excitatory and inhibitory mechanisms in human, showing that the modulation of pain

perception by female sex hormones acts specifically on endogenous pain inhibition (Tousignant-Laflamme, 2008). A similar pattern of results was observed for males where gonads-intact males showed more analgesia of their thermal hyperalgesia than castrated ones, suggesting that pain inhibitory mechanisms are recruited more efficiently in animals with intact hormonal status. It was not possible to compare the role of stress-induced analgesia (SIA) on allodynia in our two groups of males, since they all returned to pre-ligation level following the swim-test. Our results are nevertheless consistent with previous studies showing that castration reduces both opioid and non-opioid SIA in rats, while testosterone replacement reverse these deficits (Romero et al., 1987; Romero et al., 1988; Mogil et al., 1993). In the present study, ovariectomy was associated with a significant reduction in overall SIA magnitude, which is also consistent with studies of Romero et al. who demonstrated that ovariectomy reduces both opioid and non-opioid SIA in rats.

We also found a dramatic increase in GFAP staining density ipsilateral to the injury in the L4-L5 spinal cord at 28 days following a chronic constriction injury. Therefore, astrocyte activation reflects behavioural results since more pain is observed on the side of the lesion as density is higher ipsilateral to the lesion. However, in our mice subject to CCI surgery, spinal astrocytes contralaterally to nerve injury was slightly activated in spite of the absence of measurable allodynia and hyperalgesia on the contralateral hind paw of all of our animals. A possible explanation is that activated spinal astrocytes might have induced glial or neuronal changes beyond the spinal cord in higher centres such as the thalamus. Glial activation is characterized by hypertrophy, proliferation on the operated side and the up-regulation of immunoregulatory molecules.

Our results are in accordance with previous studies where robust ipsilateral and mild contralateral astrocytic activation has been characterized within the spinal cord following several peripheral nerve injuries that result in the development of allodynia (Sweitzer et al., 2001; Raghavendra et al., 2002; Milligan et al., 2003). In sham CCI mice, low and similar GFAP density was observed in both ipsilateral and contralateral sides. This is in line with the literature where glial cells are thought to be present in a resting state in non pathological conditions.

In view of the reported relation between astrocyte activation and neuropathic pain, it was expected to observe higher GFAP density in groups of mice showing the highest nociceptive behaviours, such as females and even castrated males. This was not the case, suggesting that astrocyte activation is the same regardless of the gender and hormonal status of mice as well as of the intensity of neuropathic pain at the time of sacrifice. One possible explanation for this striking result is that males could recruit distinct supraspinal inhibitory systems that also affect their behavioural responses more than spinal astrocyte activation. Said otherwise, testosterone could have an organizational and activational effect on the perception of pain level without much of an effect on the spinal reaction to peripheral nerve injury. In addition, once activated by peripheral nerve constriction, it is not clear how much time astrocytes keep on their reactive state. Therefore, GFAP density could reflect the initial nerve injury more than state of healing. Indeed, it is well described that testosterone is a potent stimulator of axonal regeneration in peripheral nerve after injury in animals (Tanzer & Jones, 1997; Jones et al., 1999; Matsumoto, 2001). Finally, it is possible that sex hormones do not modulate astrocyte directly in this model of neuropathic pain. In fact, a recent study showed that following replacement or

deprivation of estradiol, equivalent GFAP concentration were found in the two treatments groups at day 5 through 28 (McAsey et al., 2006). In another study, progesterone injected intraperitoneally on a rat model of traumatic brain injury also did not alter the expression of GFAP (Pan et al., 2007). Therefore, we conclude that the effects of gender and sex hormones documented above are not likely mediated by glial cells.

These results provide further evidence that gender and sex hormones status modulate nociception and that glial cells are activated in state of neuropathic pain. However, our data do not support that the effects of sex hormones on neuropathic pain are mediated by activated astrocytes.

References

- Aloisi, A. M. & Ceccarelli, I. (2000). Role of gonadal hormones in formalin-induced pain responses of male rats: modulation by estradiol and naloxone administration. *Neuroscience*, *95*, 559-566.
- 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.
- Barber, P. C. & Dahl, D. (1987). Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-like immunoreactivity in normal and transected rat olfactory nerve. *Exp.Brain Res.*, *65*, 681-685.
- Bennett, G. J. & Xie, Y. K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, *33*, 87-107.
- Berkley, K. J. (1997). Sex differences in pain. *Behav.Brain Sci.*, *20*, 371-380.
- Chen, R., Cohen, L. G., & Hallett, M. (2002). Nervous system reorganization following injury. *Neuroscience*, *111*, 761-773.
- Clatworthy, A. L., Illich, P. A., Castro, G. A., & Walters, E. T. (1995). Role of peri-axonal inflammation in the development of thermal hyperalgesia and guarding behavior in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci.Lett.*, *184*, 5-8.
- Colburn, R. W., Rickman, A. J., & DeLeo, J. A. (1999). The effect of site and type of nerve injury on spinal glial activation and neuropathic pain behavior. *Exp.Neurol.*, *157*, 289-304.
- Conejo, N. M., Gonzalez-Pardo, H., Pedraza, C., Navarro, F. F., Vallejo, G., & Arias, J. L. (2003). Evidence for sexual difference in astrocytes of adult rat hippocampus. *Neurosci.Lett.*, *339*, 119-122.
- Coyle, D. E. (1998). Partial peripheral nerve injury leads to activation of astroglia and microglia which parallels the development of allodynic behavior. *Glia*, *23*, 75-83.

- Coyle, D. E., Sehlhorst, C. S., & Behbehani, M. M. (1996). Intact female rats are more susceptible to the development of tactile allodynia than ovariectomized female rats following partial sciatic nerve ligation (PSNL). *Neurosci.Lett.*, *203*, 37-40.
- 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.
- DeLeo, J. A. & Yeziarski, R. P. (2001). The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. *Pain*, *90*, 1-6.
- Gaillard, R. C. & Spinedi, E. (1998). Sex- and stress-steroids interactions and the immune system: evidence for a neuroendocrine-immunological sexual dimorphism. *Domest.Anim Endocrinol.*, *15*, 345-352.
- Garcia-Estrada, J., Del Rio, J. A., Luquin, S., Soriano, E., & Garcia-Segura, L. M. (1993). Gonadal hormones down-regulate reactive gliosis and astrocyte proliferation after a penetrating brain injury. *Brain Res.*, *628*, 271-278.
- Garcia-Segura, L. M. & McCarthy, M. M. (2004). Minireview: Role of glia in neuroendocrine function. *Endocrinology*, *145*, 1082-1086.
- Garrison, C. J., Dougherty, P. M., Kajander, K. C., & Carlton, S. M. (1991). Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. *Brain Res.*, *565*, 1-7.
- 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*, 105-111.

- Gomes, F. C., Paulin, D., & Moura, N., V (1999). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz.J Med.Biol.Res.*, 32, 619-631.
- Hajos, F., Halasy, K., Gerics, B., Szalay, F., Michaloudi, E., & Papadopoulos, G. C. (2000). Ovarian cycle-related changes of glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity in the rat interpeduncular nucleus. *Brain Res.*, 862, 43-48.
- Hashizume, H., DeLeo, J. A., Colburn, R. W., & Weinstein, J. N. (2000). Spinal glial activation and cytokine expression after lumbar root injury in the rat. *Spine*, 25, 1206-1217.
- Jones, K. J., Coers, S., Storer, P. D., Tanzer, L., & Kinderman, N. B. (1999). Androgenic regulation of the central glia response following nerve damage. *J Neurobiol.*, 40, 560-573.
- Kavaliers, M. & Innes, D. (1987). Stress-induced opioid analgesia and activity in deer mice: sex and population differences. *Brain Res.*, 425, 49-56.
- Lacroix-Fralish, M. L., Rutkowski, M. D., Weinstein, J. N., Mogil, J. S., & DeLeo, J. A. (2005). The magnitude of mechanical allodynia in a rodent model of lumbar radiculopathy is dependent on strain and sex. *Spine*, 30, 1821-1827.
- Matsumoto, A. (2001). Androgen stimulates neuronal plasticity in the perineal motoneurons of aged male rats. *J Comp Neurol.*, 430, 389-395.
- Maves, T. J., Pechman, P. S., Gebhart, G. F., & Meller, S. T. (1993). Possible chemical contribution from chronic gut sutures produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 54, 57-69.
- McAsey, M. E., Cady, C., Jackson, L. M., Li, M., Randall, S., Nathan, B. P. et al. (2006). Time course of response to estradiol replacement in ovariectomized mice: brain apolipoprotein E and synaptophysin transiently increase and glial fibrillary acidic protein is suppressed. *Exp.Neurol.*, 197, 197-205.

- Meller, S. T., Dykstra, C., Grzybycki, D., Murphy, S., & Gebhart, G. F. (1994). The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. *Neuropharmacology*, *33*, 1471-1478.
- Milligan, E. D., Mehmert, K. K., Hinde, J. L., Harvey, L. O., Martin, D., Tracey, K. J. et al. (2000). Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intrathecal administration of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp120. *Brain Res.*, *861*, 105-116.
- Milligan, E. D., Twining, C., Chacur, M., Biedenkapp, J., O'Connor, K., Poole, S. et al. (2003). Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *J Neurosci.*, *23*, 1026-1040.
- Mogil, J. S. (1999). The genetic mediation of individual differences in sensitivity to pain and its inhibition. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, *96*, 7744-7751.
- Mogil, J. S., Chesler, E. J., Wilson, S. G., Juraska, J. M., & Sternberg, W. F. (2000). Sex differences in thermal nociception and morphine antinociception in rodents depend on genotype. *Neurosci.Biobehav.Rev.*, *24*, 375-389.
- Mogil, J. S., Sternberg, W. F., Kest, B., Marek, P., & Liebeskind, J. C. (1993). Sex differences in the antagonism of swim stress-induced analgesia: effects of gonadectomy and estrogen replacement. *Pain*, *53*, 17-25.
- Pan, D. S., Liu, W. G., Yang, X. F., & Cao, F. (2007). Inhibitory effect of progesterone on inflammatory factors after experimental traumatic brain injury. *Biomed Environ.Sci.*, *20*, 432-438.
- Raghavendra, V., Rutkowski, M. D., & DeLeo, J. A. (2002). The role of spinal neuroimmune activation in morphine tolerance/hyperalgesia in neuropathic and sham-operated rats. *J Neurosci.*, *22*, 9980-9989.

- Raghavendra, V., Tanga, F., & DeLeo, J. A. (2003). Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol.Exp.Ther.*, 306, 624-630.
- Riley, J. L., III, 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, 181-187.
- Romero, M. T. & Bodnar, R. J. (1986). Gender differences in two forms of cold-water swim analgesia. *Physiol Behav.*, 37, 893-897.
- Romero, M. T., Cooper, M. L., Komisaruk, B. R., & Bodnar, R. J. (1988). Gender-specific and gonadectomy-specific effects upon swim analgesia: role of steroid replacement therapy. *Physiol Behav.*, 44, 257-265.
- Romero, M. T., Kepler, K. L., Cooper, M. L., Komisaruk, B. R., & Bodnar, R. J. (1987). Modulation of gender-specific effects upon swim analgesia in gonadectomized rats. *Physiol Behav.*, 40, 39-45.
- Schwei, M. J., Honore, P., Rogers, S. D., Salak-Johnson, J. L., Finke, M. P., Ramnaraine, M. L. et al. (1999). Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. *J Neurosci.*, 19, 10886-10897.
- Sweitzer, S. M., Schubert, P., & DeLeo, J. A. (2001). Propentofylline, a glial modulating agent, exhibits antiallodynic properties in a rat model of neuropathic pain. *J Pharmacol.Exp.Ther.*, 297, 1210-1217.
- Watkins, L. R., Milligan, E. D., & Maier, S. F. (2001). Spinal cord glia: new players in pain. *Pain*, 93, 201-205.
- Watkins, L. R., Milligan, E. D., & Maier, S. F. (2003). Glial proinflammatory cytokines mediate exaggerated pain states: implications for clinical pain. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 521, 1-21.

Yunus, M. B. (2002). Gender differences in fibromyalgia and other related syndromes. *J Genet. Specif. Med.*, 5, 42-47.

Zimmermann, M. (2001). Pathobiology of neuropathic pain. *Eur. J Pharmacol.*, 429, 23-37.

Discussion

L'étude réalisée dans le cadre de cette maîtrise a permis de démontrer que les hormones sexuelles modulent à la fois les mécanismes excitateurs et inhibiteurs de la douleur neuropathique. De plus, les résultats obtenus dans la deuxième partie du projet viennent apporter une évidence supplémentaire de l'implication des cellules gliales dans ce type de douleur.

Implication des hormones sexuelles dans la douleur neuropathique

La première partie de l'étude consistait à vérifier l'implication des hormones sexuelles dans la douleur neuropathique à l'aide de tests comportementaux. Tout d'abord, chez les animaux n'ayant pas subi la constriction chronique du nerf sciatique, aucun signe de douleur neuropathique n'a pu être observé. En effet, les animaux sans lésion du nerf périphérique n'ont pas développé d'allodynie mécanique ni d'hyperalgésie thermique, les deux principales caractéristiques présentes lors de douleur neuropathique. Dans le même ordre d'idée, les animaux qui ont subi la constriction chronique du nerf sciatique ont bien développé de la douleur neuropathique caractérisée par la présence d'allodynie mécanique suite à la chirurgie tant chez le mâle que chez la femelle. Ce résultat à lui seul nous permet de conclure que notre modèle animal est valide, car il a réussi à recréer une des caractéristiques principales de la douleur neuropathique. Étonnamment, malgré la constriction chronique du nerf sciatique, les animaux n'ont pas développé d'hyperalgésie thermique. En effet, les résultats ont beaucoup varié alors que les animaux avaient un temps de latence plus court, plus long ou égal à leur temps de latence de base dans le test de Hargreaves. Ces résultats vont à l'encontre de la littérature puisque généralement les animaux avec douleur neuropathique développent de l'hyperalgésie. Par exemple, dans l'étude de Bennett, les rats avaient bien développé de l'hyperalgésie thermique suite à l'utilisation du même modèle que dans cette étude (Bennett & Xie, 1988). Cependant, quelques études ont déjà rapporté le même phénomène, c'est-à-dire que les animaux ne développaient pas ce type d'hyperalgésie suite à une lésion du nerf périphérique recréant une douleur neuropathique (Coyle et al., 1995). Il existe plusieurs explications pour ce résultat plutôt inattendu. Tout d'abord, suite à la lésion, les animaux ne posent pas leur patte lésée complètement au sol. Il est possible que la source lumineuse n'ait pas chauffé

la patte correctement et l'hyperalgésie thermique aurait donc été sous-estimée. De plus, comme les souris sont très nerveuses et sont constamment en mouvement, il était difficile de les maintenir en place suffisamment longtemps pour la durée du test, ce qui pourrait expliquer la grande variabilité dans les temps de latence observés. Une autre raison pouvant expliquer cette variabilité est le faible nombre de souris utilisées. Finalement, il a été démontré que des ligatures trop serrées peuvent causer un déficit neurologique associé à une hypoalgésie (Bennett & Xie, 1988).

L'évaluation du rôle des hormones sexuelles nous a permis de constater que les mâles avaient moins de douleur que les femelles, et ce peu importe leur statut hormonal. La testostérone, dont le rôle anti-nociceptif est bien connu, pourrait être responsable de ces résultats. Suite au test de l'allodynie mécanique, une découverte importante est que les mâles sains, avec testostérone, retournent à un niveau de base sans allodynie dès le jour 14 de l'étude alors que les mâles castrés demeurent allodyniques pour toute la durée de l'étude. Ce résultat intéressant vient renforcer l'hypothèse que la testostérone jouerait bien un rôle protecteur et permettrait une adaptation à la douleur. Il est intéressant de constater que cette récupération presque totale n'a pas été observée chez les femelles ni chez les mâles castrés. La présence de testostérone aiderait donc à la récupération et cet effet protecteur serait probablement dû à une inhibition des composantes inflammatoires par la testostérone. En effet, de nombreuses études ont démontré que la testostérone pouvaient renverser la réponse inflammatoire associée à de l'inflammation induite expérimentalement (Gaillard & Spinedi, 1998). De plus, il a été clairement démontré que le développement de la douleur neuropathique suite à la ligature était causé par l'inflammation et la réponse immune (Maves et al., 1993; Clatworthy et al., 1995). Ces résultats supportent donc l'hypothèse que la testostérone pourrait jouer son rôle protecteur en inhibant l'inflammation. Dans cette étude, une nécropsie a été effectuée sur chacune des souris pour vérifier l'état des ligatures à la fin des expérimentation au jour 28. Cette nécropsie a permis d'observer la présence d'inflammation et d'œdème autour et sur le nerf sciatique suite à la constriction chronique du nerf sciatique. Cependant, aucune analyse n'a été effectuée pour comparer le niveau d'inflammation des tissus entre les mâles et les femelles. Il aurait pu être intéressant d'effectuer cette analyse afin de voir si

la testostérone avait un effet direct sur la réduction de l'inflammation dans cette étude. Pour ce qui est des femelles, les femelles saines et ovariectomisées avaient un niveau d'allodynie mécanique comparable, suggérant que l'estrogène et la progestérone n'ont pas d'effet dans les mécanismes excitateurs de la douleur neuropathique.

Même si aucune hyperalgésie thermique n'était observée suite à la ligature, la même tendance concernant l'effet des hormones sexuelles a pu être observée dans la réponse douloureuse. En effet, les mâles avaient un niveau moindre de douleur que les femelles et que les mâles castrés. De plus, tout comme pour l'allodynie mécanique, les femelles ovariectomisées et intactes n'étaient pas différentes quant à leur niveaux d'hyperalgésie thermique. Dans notre laboratoire, les résultats obtenus dans les études précédentes réalisées chez des femelles allaient dans la même direction que les résultats obtenus dans cette étude, c'est-à-dire que les femelles intactes et ovariectomisées avaient un niveau de nociception comparable. En effet, une étude de Gaumond et al., a démontré que les hormones sexuelles femelles semblaient exercer leur effets majoritairement sur les mécanismes d'inhibition de la douleur et non au niveau des mécanismes excitateurs (Gaumond et al., 2005). Cette étude faite à l'aide du test à la formaline a démontré que dans les deux phases de douleur, les femelles avaient un niveau de nociception comparable. Par contre, lors de la phase d'inhibition active de la douleur, l'interphase, une différence était observable. Dans notre étude, le test de la nage forcée qui induit une analgésie opioïdergique par le stress a donc été effectué afin de vérifier si l'effet des hormones sexuelles était plutôt au niveau des mécanismes d'inhibition tel que démontré dans l'étude de Gaumond. Les résultats obtenus dans notre étude concordent avec ceux obtenus par Gaumond alors que suite à l'analgésie induite par le stress, il est possible de distinguer un effet de l'estrogène et/ou de la progestérone. Les femelles intactes avaient plus d'analgésie, donc moins de douleur que les femelles ovariectomisées suite à la nage forcée. Le test de la nage forcée a également été fait chez les mâles, où les résultats ont démontré que les mâles avec testostérone avaient plus d'analgésie que les mâles castrés. Les mécanismes d'inhibition de la douleur semblent donc être recrutés plus efficacement chez les animaux avec hormones, ce qui renforce une fois de plus l'hypothèse du rôle protecteur de la testostérone dans la douleur. Il n'a pas été possible de comparer

l'analgésie entre les mâles et les femelles, puisque nous n'avons pas pu vérifier l'analgésie chez les mâles dans le test de l'allodynie mécanique. En effet, suite à la nage forcée, tous les mâles sont retournés au niveau de base, soit au seuil de retrait de 4 g, et il n'était donc pas possible de discriminer l'analgésie chez les mâles. Les résultats obtenus pour l'analgésie induite par le stress concordent avec les études précédentes où il a été démontré que la castration diminuait l'analgésie induite par le stress à la fois opioïdérique et non opioïdérique, un déficit qui était réinstauré par la supplémentation en testostérone (Romero et al., 1987; Romero et al., 1988; Mogil et al., 1993). De plus, une autre étude a démontré que l'ovariectomie résultait en une baisse significative de l'analgésie induite par le stress opioïdérique et non opioïdérique (Romero et al., 1988).

Implication des cellules gliales dans la douleur neuropathique

La deuxième partie de l'étude consistait à confirmer l'implication des cellules gliales dans la douleur neuropathique. Tout d'abord, chez les animaux qui n'ont pas eu la constriction chronique du nerf sciatique, donc sans douleur neuropathique, aucune activation du GFAP n'a été observée et la densité entre le côté controlatéral et ipsilatéral était comparable. Par contre, il a tout de même été possible d'observer un léger marquage dans les régions L4 et L5 de la moëlle épinière suggérant que le GFAP est présent de façon basale. Ces résultats concordent avec la littérature qui soutient qu'au repos les cellules gliales ne sont pas activées mais sont tout de même présentes. Chez les animaux avec douleur neuropathique, nous avons démontré une augmentation marquée du GFAP du côté ipsilatéral au niveau L4-L5 de la moëlle épinière et une densité plus élevée du côté de la lésion comparativement au côté sans lésion. Ces résultats viennent donc renforcer l'hypothèse que les cellules gliales sont bien activées lors de lésions provoquant une douleur neuropathique. De nombreuses études ont déjà démontré une activation astrocytique robuste du côté ipsilatéral et une activation légère du côté controlatéral suite à différents types de lésion du nerf périphérique (DeLeo and Colburn, 1996; Colburn et al., 1997; Coyle, 1998). De plus, les résultats obtenus au niveau moléculaire reflètent bien les résultats obtenus au niveau comportemental. En effet, chez les animaux sans douleur neuropathique, la densité du marquage immunohistochimique pour le GFAP entre le côté controlatéral et ipsilatéral était beaucoup moins prononcée et comparable. Chez les

animaux avec douleur neuropathique, une prolifération des cellules gliales ainsi qu'une hypertrophie étaient effectivement observées. De plus, l'augmentation de la densité du GFAP était surtout observée du côté ipsilatéral, côté ayant eu la lésion et présentant plus de nociception. Cependant, durant les 28 jours de l'étude, les cellules gliales ont été activées du côté controlatéral bien que l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique n'étaient pas observées sur cette patte, suggérant ainsi que les signaux de douleur étaient présents au niveau de la moëlle mais que pour une raison quelconque, ils ne se rendaient pas au cerveau. Des études ont également démontré le même phénomène, soit une activation des cellules gliales du côté controlatéral suite à une lésion au nerf périphérique alors qu'aucun changement n'était observé dans les seuils de retrait de la patte controlatérale (Coyle, 1998; Clark et al., 2006). La testostérone pourrait en être la raison et jouerait peut-être à un autre niveau, par exemple au niveau cortical, car la douleur ressentie est particulièrement moindre chez les mâles. Il est également possible que l'intensité de la douleur ne soit pas directement corrélée avec l'intensité de la densité du GFAP. Les astrocytes spinaux activés peuvent avoir induit des changements neuronaux ou des cellules gliales au-delà de la moëlle épinière dans des centres supérieurs, comme le thalamus. Finalement, il est possible que l'activation des cellules gliales persiste plus longtemps que l'allodynie ou l'hyperalgésie. Une étude a vérifié la relation entre le développement de l'allodynie mécanique et l'activation des cellules gliales sur une période de 84 jours suivant la lésion au nerf périphérique (Coyle, 1998). Dès le deuxième jour post-lésion, le GFAP a pu être observé de façon significative du côté controlatéral. Au jour 14, le GFAP était à son intensité maximale, alors qu'à partir du jour 28, une légère diminution était observée bien que le GFAP était toujours présent au jour 84. Toutefois, la présence d'allodynie était beaucoup moins importante dès le jour 56 (Coyle, 1998). Il aurait été intéressant de vérifier l'expression du GFAP à différents jours de tests pour voir à quel moment les astrocytes commencent leur prolifération suite à l'induction de la lésion. Dans cette étude, l'analyse a été effectuée seulement au jour 28 alors que la douleur neuropathique était bien développée et que l'intensité du GFAP avait atteint son niveau maximal.

Bien que seuls les résultats des lames I-II et IV-V aient été présentés, la densité du GFAP a été analysée dans différentes régions de la corne dorsale. Les lames I-II sont particulièrement importantes puisqu'elles reçoivent, entre autres, la majorité des afférences des fibres nociceptives A δ et C. La lame III a également été analysée, celle-ci recevant les informations des fibres non-nociceptives A β . Ensuite, les lames IV-V, qui reçoivent la majorité des afférences des fibres non-nociceptives A β et la lame X qui reçoit les afférences de basses et hautes intensités ont également fait l'objet d'analyse (Besson & Chaouch 1987; Williams et al., 1990). L'observation subjective laisse croire que l'augmentation de la densité du GFAP n'est pas restreinte à une région en particulier dans les régions lombaires L4-L5. Dans toutes les couches de la corne dorsale les astrocytes sont hypertrophiés suggérant que la réponse des astrocytes n'est pas limitée à la région de terminaison des fibres afférentes primaires. Dans cette étude, seulement le marqueur pour les astrocytes, le GFAP, a été étudié. Par contre, il aurait été intéressant de vérifier le rôle de la microglie pour établir l'origine du développement de la douleur. Il n'est pas encore tout à fait clair quels types de cellules gliales jouent un rôle majeur dans l'initiation et le maintien de la douleur chronique. Il semblerait que la microglie soit la première cellule à répondre dans le SNC après une lésion et les produits relâchés par la microglie activée amènerait l'activation des astrocytes qui maintiendraient les états pathologiques (Kreutzberg et al., 1996; Popovich et al., 1997).

Relations entre les cellules gliales et les hormones sexuelles dans la douleur neuropathique

Un point important démontré par cette étude est que tous les groupes, indépendamment de leur statut hormonal, ont une densité équivalente de GFAP malgré des comportements nociceptifs plus élevés chez les femelles et même chez les mâles castrés. Ces résultats suggèrent donc que l'activation des cellules gliales est la même peu importe l'intensité de la douleur ressentie. Par exemple, les mâles castrés et les mâles avec testostérone ont une densité équivalente bien que les mâles avec testostérone aient moins de nociception. Une façon d'expliquer ces résultats serait que les mâles peuvent recruter des systèmes inhibiteurs supra-spinaux qui affectent également leur réponse comportementale et ce, grâce à la testostérone. La transmission de l'information douloureuse au niveau de la

moelle épinière est donc présente mais la testostérone semble diminuer le niveau de douleur, suggérant que la testostérone peut exercer son effet à un autre niveau. Il est connu que la testostérone peut améliorer la récupération neuronale en promouvant la régénération axonale, la synaptogénèse et la neurogénèse (Chen et al., 2002). En effet, des études animales ont démontré que la testostérone est un stimulateur de la régénération axonale des nerfs périphériques après une lésion (Jones et al., 1999; Matsumoto, 2001). Une étude a également démontré que la testostérone pouvait aussi améliorer la guérison après une blessure en diminuant la glie réactive qui forme une barrière mécanique et chimique à la régénération axonale après une attaque (Garcia-Estrada et al., 1993; Silver 2004). Il est également possible que l'intensité de la douleur ne soit pas corrélée directement avec l'intensité de la densité des cellules gliales. Une étude de Colburn et al., comparant l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique à l'activation des cellules gliales à différents temps suivant la lésion au nerf périphérique a démontré un manque de corrélation entre les deux. Chez certains rats, il était possible d'observer des comportements douloureux alors qu'il y avait une absence apparente d'activation des cellules gliales ou alors une forte réponse microgliale bien qu'aucun comportement douloureux n'était présent (Colburn et al., 1997). Une autre façon d'expliquer ce phénomène serait que les hormones sexuelles n'ont pas d'effet sur les cellules gliales et donc sur la douleur neuropathique associée à ces cellules. Par contre, quelques études ont démontré que les hormones sexuelles avaient la capacité de moduler l'expression du GFAP. Par exemple, l'immunoréactivité du GFAP varie durant le cycle menstruel du rat, autant suite à une ovariectomie qu'à des manipulations des hormones ovariennes au cerveau, confirmant ainsi que les cellules gliales sont susceptibles aux effets des hormones stéroïdiennes (Martinez et al., 2006). De plus, les femelles en phase diestrus de leur cycle menstruel ont plus de GFAP que les mâles (Rasia-Filho et al., 2002). Cependant, une étude récente a montré que suite à un remplacement ou une déprivation en estradiol, une concentration équivalente de GFAP était trouvée dans les deux groupes jusqu'au jour 28 (McAsey et al., 2006). Finalement, une autre étude a démontré que l'injection intra-péritonéale de progestérone n'altérait pas l'expression de GFAP dans un modèle de traumatisme crânien chez le rat (Pan et al., 2007). L'effet des hormones sexuelles sur les cellules gliales pourrait être lié à la présence des récepteurs des

hormones sexuelles sur les cellules gliales (Garcia-Segura & McCarthy, 2004). Si quelques études ont malgré tout démontré que les hormones sexuelles pouvaient influencer l'activation et la prolifération des cellules gliales, les résultats obtenus dans cette étude ont cependant démontré que le sexe et le statut hormonal n'ont pas eu d'influence sur l'expression du GFAP dans ce modèle de douleur neuropathique, du moins au moment du sacrifice des souris.

Conclusion

De nombreuses études ont démontré le rôle des hormones sexuelles dans les différences observées entre les hommes et les femmes au niveau de la douleur, particulièrement aiguë et tonique. Dans cette étude, nous avons voulu vérifier l'hypothèse que les hormones sexuelles modulaient également ces différences dans la douleur neuropathique. À l'aide d'un modèle animal de douleur neuropathique, nous avons pu vérifier l'implication des hormones sexuelles dans ce type de douleur. De plus, l'implication des cellules gliales a également été étudiée puisque celles-ci jouent un rôle déterminant dans l'initiation et le maintien de la douleur neuropathique. Finalement, une relation possible entre l'activation des cellules gliales et les hormones sexuelles a été vérifiée.

Les résultats obtenus dans cette étude viennent une fois de plus supporter l'hypothèse que les hormones sexuelles ont un impact majeur sur les mécanismes excitateurs et inhibiteurs de la douleur. Les femelles ont plus de nociception que les mâles alors que les mâles castrés ont eux aussi plus de nociception que les mâles sains, ce qui laisse croire que la testostérone exerce un rôle protecteur important. De plus, les cellules gliales semblent être des modulateurs majeurs de la douleur, puisque leur expression est dramatiquement augmentée chez les animaux avec douleur neuropathique. Il serait important d'investiguer davantage ce sujet puisque des inhibiteurs des cellules gliales pourraient faire partie d'une nouvelle gamme de médicaments destinés à prévenir ou diminuer la douleur. Par contre, suite aux résultats obtenus, il semble que l'expression des cellules gliales ne soit pas médiée par les hormones sexuelles.

Ces résultats démontrent qu'il est important de poursuivre l'étude des hormones sexuelles dans la douleur puisque celles-ci jouent un rôle majeur dans les mécanismes de la douleur. Il serait intéressant de poursuivre cette étude chez des souris KO afin d'évaluer le rôle des récepteurs aux hormones sexuelles dans la douleur neuropathique. Ainsi, l'étude des différences dans les processus douloureux et d'analgésie aidera à mieux comprendre la prévalence de maladies de douleurs chroniques chez les femmes dans le but de limiter ce problème, permettant ultimement de mieux orienter le traitement.

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr. Serge Marchand, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je suis privilégiée d'avoir pu parfaire ma formation dans une équipe aussi dynamique et dans une ambiance aussi amicale. Merci de m'avoir fait confiance en me laissant beaucoup d'autonomie et de responsabilités.

Je tiens également à remercier ma co-directrice de recherche, Dre. Julie Carrier, qui m'a aussi accueillie dans son laboratoire. Ses nombreux conseils et commentaires m'ont été grandement utiles.

Un gros merci à Marie-France Spooner. Ton aide lors des chirurgies a été considérable et tes nombreux conseils tout au long de ma maîtrise m'ont énormément aidé. Par-dessus tout, merci pour ton amitié; sans toi ces deux années passées au CHUS n'auraient certainement pas été aussi agréables !!

Un merci à Karine Belleville pour m'avoir montré la plupart des techniques avec une rigueur et un souci du détail exemplaire. Merci également à Maxime Gallant. Ton aide et tes nombreuses connaissances techniques m'ont souvent épargné de nombreuses pertes de temps !

Je remercie aussi toute la merveilleuse équipe du laboratoire du Dr Marchand. Particulièrement, Émilie, Édith et Mylène pour leur amitié Un gros merci à Philippe Goffaux pour son aide avec les statistiques et les écrits en anglais. Je remercie également ma collègue du côté animal, Marie-Andrée, avec qui nos échanges m'ont souvent permis de répondre à de nombreuses questions et incertitudes.

Références

- Aloisi, A. M. (2000). Sensory effects of gonadal hormones. In R.B.Fillingim (Ed.), *Sex, Gender and Pain* (IASP Press ed., pp. 7-24). Seattle.
- Aloisi, A. M. (2003). Gonadal hormones and sex differences in pain reactivity. *Clin.J.Pain, 19*, 168-174.
- 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., 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*, 262-264.
- Attal, N., Jazat, F., Kayser, V., & Guilbaud, G. (1990). Further evidence for 'pain-related' behaviours in a model of unilateral peripheral mononeuropathy. *Pain, 41*, 235-251.
- Azcoitia, I., Sierra, A., & Garcia-Segura, L. M. (1999). Localization of estrogen receptor beta-immunoreactivity in astrocytes of the adult rat brain. *Glia, 26*, 260-267.
- Behl, C. & Manthey, D. (2000). Neuroprotective activities of estrogen: an update. *J Neurocytol., 29*, 351-358.
- Bennett, G. J. & Xie, Y. K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain, 33*, 87-107.
- Berkley, K. J. (1997). Sex differences in pain. *Behav.Brain Sci., 20*, 371-380.
- Bijlsma, J. W. (1999). Can we use steroid hormones to immunomodulate rheumatic diseases? Rheumatoid arthritis as an example. *Ann.N.Y.Acad.Sci., 876*, 366-376.
- Brake, W. G., Alves, S. E., Dunlop, J. C., Lee, S. J., Bulloch, K., Allen, P. B. et al. (2001). Novel target sites for estrogen action in the dorsal hippocampus: an examination of synaptic proteins. *Endocrinology, 142*, 1284-1289.

- Castro-Lopes, J. M., Tavares, I., & Coimbra, A. (1993). GABA decreases in the spinal cord dorsal horn after peripheral neurectomy. *Brain Res.*, *620*, 287-291.
- Ceccarelli, I., Scaramuzzino, A., Massafra, C., & Aloisi, A. M. (2003). The behavioral and neuronal effects induced by repetitive nociceptive stimulation are affected by gonadal hormones in male rats. *Pain*, *104*, 35-47.
- Chen, R., Cohen, L. G., & Hallett, M. (2002). Nervous system reorganization following injury. *Neuroscience*, *111*, 761-773.
- Clark, A. K., Gentry, C., Bradbury, E. J., McMahon, S. B., & Malcangio, M. (2007). Role of spinal microglia in rat models of peripheral nerve injury and inflammation. *Eur J Pain*, *11*, 223-230.
- Clatworthy, A. L., Illich, P. A., Castro, G. A., & Walters, E. T. (1995). Role of peri-axonal inflammation in the development of thermal hyperalgesia and guarding behavior in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci.Lett.*, *184*, 5-8.
- Colburn, R. W., DeLeo, J. A., Rickman, A. J., Yeager, M. P., Kwon, P., & Hickey, W. F. (1997). Dissociation of microglial activation and neuropathic pain behaviors following peripheral nerve injury in the rat. *J Neuroimmunol.*, *79*, 163-175.
- Colburn, R. W., Rickman, A. J., & DeLeo, J. A. (1999). The effect of site and type of nerve injury on spinal glial activation and neuropathic pain behavior. *Exp.Neurol.*, *157*, 289-304.
- Coull, J. A., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, S. A., Nault, F., Sik, A. et al. (2003). Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature*, *424*, 938-942.
- Coyle, D. E., Sehlhorst, C. S., & Behbehani, M. M. (1996). Intact female rats are more susceptible to the development of tactile allodynia than ovariectomized female rats following partial sciatic nerve ligation (PSNL). *Neurosci.Lett.*, *203*, 37-40.

- Coyle, D. E., Sehlhorst, C. S., & Mascari, C. (1995). Female rats are more susceptible to the development of neuropathic pain using the partial sciatic nerve ligation (PSNL) model. *Neurosci.Lett.*, *186*, 135-138.
- Craft, R. M. (2003a). Sex differences in drug- and non-drug-induced analgesia. *Life Sci.*, *72*, 2675-2688.
- Craft, R. M. (2003b). Sex differences in opioid analgesia: "from mouse to man". *Clin.J.Pain*, *19*, 175-186.
- 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.
- Culmsee, C., Junker, V., Wolz, P., Semkova, I., & Krieglstein, J. (1998). Lubeluzole protects hippocampal neurons from excitotoxicity in vitro and reduces brain damage caused by ischemia. *Eur.J Pharmacol.*, *342*, 193-201.
- Cutolo, M., Balleari, E., Giusti, M., Intra, E., & Accardo, S. (1991). Androgen replacement therapy in male patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, *34*, 1-5.
- Das, A. & Chaudhuri, S. K. (1995). Effects of sex steroids on the concentrations of some brain neurotransmitters in male and female rats: some new observations. *Indian J Physiol Pharmacol.*, *39*, 223-230.
- Davis, M. P., Shaiova, L. A., & Angst, M. S. (2007). When opioids cause pain. *J Clin.Oncol.*, *25*, 4497-4498.
- Decosterd, I. & Woolf, C. J. (2000). Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*, *87*, 149-158.
- Del, C. S., Garcia-Estrada, J., & Garcia-Segura, L. M. (1995). Neuroactive steroids regulate astroglia morphology in hippocampal cultures from adult rats. *Glia*, *14*, 65-71.
- Deroo, B. J. & Korach, K. S. (2006). Estrogen receptors and human disease. *J Clin.Invest*, *116*, 561-570.

- Dickenson, A. H., Chapman, V., & Green, G. M. (1997). The pharmacology of excitatory and inhibitory amino acid-mediated events in the transmission and modulation of pain in the spinal cord. *Gen.Pharmacol.*, 28, 633-638.
- Dougherty, P. M., Garrison, C. J., & Carlton, S. M. (1992). Differential influence of local anesthetic upon two models of experimentally induced peripheral mononeuropathy in the rat. *Brain Res.*, 570, 109-115.
- Dowdall, T., Robinson, I., & Meert, T. F. (2005). Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 80, 93-108.
- Eaton, M. J., Martinez, M. A., & Karmally, S. (1999). A single intrathecal injection of GABA permanently reverses neuropathic pain after nerve injury. *Brain Res.*, 835, 334-339.
- Evrard, H. C. & Balthazart, J. (2004). Aromatization of androgens into estrogens reduces response latency to a noxious thermal stimulus in male quail. *Horm.Behav.*, 45, 181-189.
- Fillingim, R. B. & Ness, T. J. (2000). Sex-related hormonal influences on pain and analgesic responses. *Neurosci.Biobehav.Rev.*, 24, 485-501.
- Gaillard, R. C. & Spinedi, E. (1998). Sex- and stress-steroids interactions and the immune system: evidence for a neuroendocrine-immunological sexual dimorphism. *Domest.Anim Endocrinol.*, 15, 345-352.
- Garcia-Estrada, J., Del Rio, J. A., Luquin, S., Soriano, E., & Garcia-Segura, L. M. (1993). Gonadal hormones down-regulate reactive gliosis and astrocyte proliferation after a penetrating brain injury. *Brain Res.*, 628, 271-278.
- Garrison, C. J., Dougherty, P. M., Kajander, K. C., & Carlton, S. M. (1991). Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. *Brain Res.*, 565, 1-7.

- Gaumond, I., Arseneault, P., & Marchand, S. (2002). The role of sex hormones on formalin-induced nociceptive responses. *Brain Res.*, *958*, 139-145.
- Gaumond, I., Arseneault, P., & Marchand, S. (2005). Specificity of female and male sex hormones on excitatory and inhibitory phases of formalin-induced nociceptive responses. *Brain Res.*, *1052*, 105-111.
- Gaumond, I., Spooner, M., & Marchand, S. (2006). Sex differences in pain inhibitory mechanisms in the interphase of the formalin test (soumis). *Journal of regulatory, comparative and integrative physiology*.
- Gear, R. W., Miaskowski, C., Gordon, N. C., Paul, S. M., Heller, P. H., & Levine, J. D. (1996). Kappa-opioids produce significantly greater analgesia in women than in men. *Nat. Med.*, *2*, 1248-1250.
- Gehrmann, J., Matsumoto, Y., & Kreutzberg, G. W. (1995). Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, *20*, 269-287.
- Gould, E., Woolley, C. S., Frankfurt, M., & McEwen, B. S. (1990). Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci.*, *10*, 1286-1291.
- Green, P. G., Dahlqvist, S. R., Isenberg, W. M., Strausbaugh, H. J., Miao, F. J., & Levine, J. D. (1999). Sex steroid regulation of the inflammatory response: sympathoadrenal dependence in the female rat. *J Neurosci.*, *19*, 4082-4089.
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., & Joris, J. (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, *32*, 77-88.
- Hashizume, H., DeLeo, J. A., Colburn, R. W., & Weinstein, J. N. (2000). Spinal glial activation and cytokine expression after lumbar root injury in the rat. *Spine*, *25*, 1206-1217.
- Horvath, T. L. & Wikler, K. C. (1999). Aromatase in developing sensory systems of the rat brain. *J Neuroendocrinol.*, *11*, 77-84.

- IASP (1979). Pain terms: a list with definitions and notes on usage. *Pain*, 6, 249.
- Jones, K. J., Coers, S., Storer, P. D., Tanzer, L., & Kinderman, N. B. (1999). Androgenic regulation of the central glia response following nerve damage. *J Neurobiol.*, 40, 560-573.
- Julien, N., Goffaux, P., Arseneault, P., & Marchand, S. (2005). Widespread pain in fibromyalgia is related to a deficit of endogenous pain inhibition. *Pain*, 114, 295-302.
- Julius, D. & Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413, 203-210.
- Kastrup, Y., Hallbeck, M., Amandusson, A., Hirata, S., Hermanson, O., & Blomqvist, A. (1999). Progesterone receptor expression in the brainstem of the female rat. *Neurosci.Lett.*, 275, 85-88.
- Kavaliers, M., Colwell, D. D., & Perrot-Sinal, T. S. (1997). Opioid and non-opioid NMDA-mediated predator-induced analgesia in mice and the effects of parasitic infection. *Brain Res.*, 766, 11-18.
- Kavaliers, M. & Galea, L. A. (1995). Sex differences in the expression and antagonism of swim stress-induced analgesia in deer mice vary with the breeding season. *Pain*, 63, 327-334.
- Kest, B., Sarton, E., & Dahan, A. (2000). Gender differences in opioid-mediated analgesia: animal and human studies. *Anesthesiology*, 93, 539-547.
- Kim, K. J., Yoon, Y. W., & Chung, J. M. (1997). Comparison of three rodent neuropathic pain models. *Exp.Brain Res.*, 113, 200-206.
- Kim, S. H. & Chung, J. M. (1992). An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*, 50, 355-363.
- Kingery, W. S. (1997). A critical review of controlled clinical trials for peripheral neuropathic pain and complex regional pain syndromes. *Pain*, 73, 123-139.
- Koltzenburg, M. & Scadding, J. (2001). Neuropathic pain. *Curr.Opin.Neurol.*, 14, 641-647.

- Kondo, D., Yabe, R., Kurihara, T., Saegusa, H., Zong, S., & Tanabe, T. (2006). Progesterone receptor antagonist is effective in relieving neuropathic pain. *Eur.J Pharmacol.*, *541*, 44-48.
- Lacroix-Fralish, M. L., Rutkowski, M. D., Weinstein, J. N., Mogil, J. S., & DeLeo, J. A. (2005). The magnitude of mechanical allodynia in a rodent model of lumbar radiculopathy is dependent on strain and sex. *Spine*, *30*, 1821-1827.
- Lacroix-Fralish, M. L., Tawfik, V. L., Nutile-McMenemy, N., & DeLeo, J. A. (2006). Progesterone mediates gonadal hormone differences in tactile and thermal hypersensitivity following L5 nerve root ligation in female rats. *Neuroscience*, *138*, 601-608.
- Lahita, R. G. (1996). The connective tissue diseases and the overall influence of gender. *Int.J Fertil.Menopausal Stud.*, *41*, 156-165.
- Lambert, J. J., Belelli, D., Peden, D. R., Vardy, A. W., & Peters, J. A. (2003). Neurosteroid modulation of GABAA receptors. *Prog.Neurobiol.*, *71*, 67-80.
- Le Bars, D. & Adam, F. (2002). [Nociceptors and mediators in acute inflammatory pain]. *Ann.Fr.Anesth.Reanim.*, *21*, 315-335.
- Le Bars, D., Dickenson, A. H., & Besson, J. M. (1979). Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). 1. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. *Pain*, *6*, 283-304 (a).
- Lekan, H. A., Carlton, S. M., & Coggeshall, R. E. (1996). Sprouting of A beta fibers into lamina II of the rat dorsal horn in peripheral neuropathy. *Neurosci.Lett.*, *208*, 147-150.
- Leo, S., Straetmans, 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.

- Levin-Allerhand, J., McEwen, B. S., Lominska, C. E., Lubahn, D. B., Korach, K. S., & Smith, J. D. (2001). Brain region-specific up-regulation of mouse apolipoprotein E by pharmacological estrogen treatments. *J Neurochem.*, *79*, 796-803.
- Lin, S. M., Tsao, C. M., Tsai, S. K., & Mok, M. S. (2002). Influence of testosterone on autotomy in castrated male rats. *Life Sci.*, *70*, 2335-2340.
- Linton, S. J. & Gotestam, K. G. (1984). A controlled study of the effects of applied relaxation and applied relaxation plus operant procedures in the regulation of chronic pain. *Br.J Clin.Psychol.*, *23 (Pt 4)*, 291-299.
- Lipa, S. M. & Kavaliers, M. (1990). Sex differences in the inhibitory effects of the NMDA antagonist, MK-801, on morphine and stress-induced analgesia. *Brain Res.Bull.*, *24*, 627-630.
- Liu, M., Hurn, P. D., Roselli, C. E., & Alkayed, N. J. (2007). Role of P450 aromatase in sex-specific astrocytic cell death. *J Cereb.Blood Flow Metab.*, *27*, 135-141.
- MacLusky, N. J. & McEwen, B. S. (1978). Oestrogen modulates progesterin receptor concentrations in some rat brain regions but not in others. *Nature*, *274*, 276-278.
- Majewska, M. D., Harrison, N. L., Schwartz, R. D., Barker, J. L., & Paul, S. M. (1986). Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science*, *232*, 1004-1007.
- Mani, S. K. (2006). Signaling mechanisms in progesterone-neurotransmitter interactions. *Neuroscience*, *138*, 773-781.
- Marchand, S. (2005). Neurophysiologie de la douleur. In P.Beaulieu (Ed.), *Pharmacologie de la douleur* (pp. 3-37). Les presses de l'Université de Montréal.
- Marcus, D. A. (1995). Interrelationships of neurochemicals, estrogen, and recurring headache. *Pain*, *62*, 129-139.

- Matsumoto, A. (2001). Androgen stimulates neuronal plasticity in the perineal motoneurons of aged male rats. *J Comp Neurol.*, 430, 389-395.
- Matzner, O. & Devor, M. (1994). Hyperexcitability at sites of nerve injury depends on voltage-sensitive Na⁺ channels. *J Neurophysiol.*, 72, 349-359.
- Maves, T. J., Pechman, P. S., Gebhart, G. F., & Meller, S. T. (1993). Possible chemical contribution from chronic gut sutures produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 54, 57-69.
- McAsey, M. E., Cady, C., Jackson, L. M., Li, M., Randall, S., Nathan, B. P. et al. (2006). Time course of response to estradiol replacement in ovariectomized mice: brain apolipoprotein E and synaptophysin transiently increase and glial fibrillary acidic protein is suppressed. *Exp.Neurol.*, 197, 197-205.
- McEwen, B. (2002). Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog.Horm.Res.*, 57, 357-384.
- Meller, S. T., Dykstra, C., Grzybycki, D., Murphy, S., & Gebhart, G. F. (1994). The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. *Neuropharmacology*, 33, 1471-1478.
- Melzack, R. & Wall, P. D. (1965). Pain mechanisms: a new theory. *Science*, 150, 971-979.
- Mensah-Nyagan, A. G., Do-Rego, J. L., Beaujean, D., Luu-The, V., Pelletier, G., & Vaudry, H. (1999). Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacol.Rev.*, 51, 63-81.
- Merchenthaler, I., Lane, M. V., Numan, S., & Dellovade, T. L. (2004). Distribution of estrogen receptor alpha and beta in the mouse central nervous system: in vivo autoradiographic and immunocytochemical analyses. *J Comp Neurol.*, 473, 270-291.
- Millan, M. J. (2002). Descending control of pain. *Prog.Neurobiol.*, 66, 355-474.

- Milligan, E. D., Mehmert, K. K., Hinde, J. L., Harvey, L. O., Martin, D., Tracey, K. J. et al. (2000). Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intrathecal administration of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp120. *Brain Res.*, *861*, 105-116.
- Milligan, E. D., Twining, C., Chacur, M., Biedenkapp, J., O'Connor, K., Poole, S. et al. (2003). Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *J Neurosci.*, *23*, 1026-1040.
- 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*, 2055-2067.
- Mogil, J. S. (1999). The genetic mediation of individual differences in sensitivity to pain and its inhibition. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, *96*, 7744-7751.
- Mogil, J. S., Chesler, E. J., Wilson, S. G., Juraska, J. M., & Sternberg, W. F. (2000). Sex differences in thermal nociception and morphine antinociception in rodents depend on genotype. *Neurosci.Biobehav.Rev.*, *24*, 375-389.
- 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*, 123-132.
- Mogil, J. S., Sternberg, W. F., Kest, B., Marek, P., & Liebeskind, J. C. (1993). Sex differences in the antagonism of swim stress-induced analgesia: effects of gonadectomy and estrogen replacement. *Pain*, *53*, 17-25.
- Montgomery, G. H., Bovbjerg, D. H., Schnur, J. B., David, D., Goldfarb, A., Weltz, C. R. et al. (2007). A randomized clinical trial of a brief hypnosis intervention to control side effects in breast surgery patients. *J Natl.Cancer Inst.*, *99*, 1304-1312.

- Moore, K. A., Kohno, T., Karchewski, L. A., Scholz, J., Baba, H., & Woolf, C. J. (2002). Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci.*, *22*, 6724-6731.
- Munger, B. L., Bennett, G. J., & Kajander, K. C. (1992). An experimental painful peripheral neuropathy due to nerve constriction. I. Axonal pathology in the sciatic nerve. *Exp.Neurol.*, *118*, 204-214.
- Nelson, K. A., Park, K. M., Robinovitz, E., Tsigos, C., & Max, M. B. (1997). High-dose oral dextromethorphan versus placebo in painful diabetic neuropathy and postherpetic neuralgia. *Neurology*, *48*, 1212-1218.
- Ocvirk, R., Murphy, B. E., Franklin, K. B., & Abbott, F. V. (2008). Antinociceptive profile of ring A-reduced progesterone metabolites in the formalin test. *Pain*.
- Ossipov, M. H., Bian, D., Malan, T. P., Jr., Lai, J., & Porreca, F. (1999). Lack of involvement of capsaicin-sensitive primary afferents in nerve-ligation injury induced tactile allodynia in rats. *Pain*, *79*, 127-133.
- Pan, D. S., Liu, W. G., Yang, X. F., & Cao, F. (2007). Inhibitory effect of progesterone on inflammatory factors after experimental traumatic brain injury. *Biomed Environ.Sci.*, *20*, 432-438.
- Pan, Y., Zhang, H., Acharya, A. B., Patrick, P. H., Oliver, D., & Morley, J. E. (2005). Effect of testosterone on functional recovery in a castrate male rat stroke model. *Brain Res.*, *1043*, 195-204.
- Panerai, A. E., Sacerdote, P., Brini, A., & Mantegazza, P. (1987). Analgesic effect of morphine: a role for beta-endorphin. *Neurosci.Lett.*, *74*, 348-352.
- Papka, R. E., Williams, S., Miller, K. E., Copelin, T., & Puri, P. (1998). CNS location of uterine-related neurons revealed by trans-synaptic tracing with pseudorabies virus and their relation to estrogen receptor-immunoreactive neurons. *Neuroscience*, *84*, 935-952.
- Paul, S. M. & Purdy, R. H. (1992). Neuroactive steroids. *FASEB J*, *6*, 2311-2322.

- Pielsticker, A., Haag, G., Zaudig, M., & Lautenbacher, S. (2005). Impairment of pain inhibition in chronic tension-type headache. *Pain, 118*, 215-223.
- Pierson, R. C., Lyons, A. M., & Greenfield, L. J., Jr. (2005). Gonadal steroids regulate GABAA receptor subunit mRNA expression in NT2-N neurons. *Brain Res.Mol.Brain Res., 138*, 105-115.
- Raghavendra, V., Rutkowski, M. D., & DeLeo, J. A. (2002). The role of spinal neuroimmune activation in morphine tolerance/hyperalgesia in neuropathic and sham-operated rats. *J Neurosci., 22*, 9980-9989.
- Raghavendra, V., Tanga, F., & DeLeo, J. A. (2003). Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol.Exp.Ther., 306*, 624-630.
- Rainville, P., Carrier, B., Hofbauer, R. K., Bushnell, M. C., & Duncan, G. H. (1999). Dissociation of sensory and affective dimensions of pain using hypnotic modulation. *Pain, 82*, 159-171.
- Rainville, P., Hofbauer, R. K., Bushnell, M. C., Duncan, G. H., & Price, D. D. (2002). Hypnosis modulates activity in brain structures involved in the regulation of consciousness. *J Cogn Neurosci., 14*, 887-901.
- Riley, J. L., III, Robinson, M. E., Wise, E. A., & Price, D. D. (1999). A meta-analytic review of pain perception across the menstrual cycle. *Pain, 81*, 225-235.
- Romero, M. T. & Bodnar, R. J. (1986). Gender differences in two forms of cold-water swim analgesia. *Physiol Behav., 37*, 893-897.
- Romero, M. T., Cooper, M. L., Komisaruk, B. R., & Bodnar, R. J. (1988). Gender-specific and gonadectomy-specific effects upon swim analgesia: role of steroid replacement therapy. *Physiol Behav., 44*, 257-265.

- Romero, M. T., Kepler, K. L., Cooper, M. L., Komisaruk, B. R., & Bodnar, R. J. (1987). Modulation of gender-specific effects upon swim analgesia in gonadectomized rats. *Physiol Behav.*, *40*, 39-45.
- Roselli, C. E., Abdelgadir, S. E., & Resko, J. A. (1997). Regulation of aromatase gene expression in the adult rat brain. *Brain Res.Bull.*, *44*, 351-357.
- Rosenberg, J. M., Harrell, C., Ristic, H., Werner, R. A., & de Rosayro, A. M. (1997). The effect of gabapentin on neuropathic pain. *Clin.J Pain*, *13*, 251-255.
- Scholz, J. & Woolf, C. J. (2007). The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat.Neurosci.*, *10*, 1361-1368.
- Schwei, M. J., Honore, P., Rogers, S. D., Salak-Johnson, J. L., Finke, M. P., Ramnaraine, M. L. et al. (1999). Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. *J Neurosci.*, *19*, 10886-10897.
- Scott, C. J., Rawson, J. A., Pereira, A. M., & Clarke, I. J. (1998). The distribution of estrogen receptors in the brainstem of female sheep. *Neurosci.Lett.*, *241*, 29-32.
- Seltzer, Z., Dubner, R., & Shir, Y. (1990). A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*, *43*, 205-218.
- Simonnet, G. & Rivat, C. (2003). Opioid-induced hyperalgesia: abnormal or normal pain? *Neuroreport*, *14*, 1-7.
- Sinchak, K., Eckersell, C., Quezada, V., Norell, A., & Micevych, P. (2000). Preproenkephalin mRNA levels are regulated by acute stress and estrogen stimulation. *Physiol Behav.*, *69*, 425-432.
- Sohrabji, F., Miranda, R. C., & Toran-Allerand, C. D. (1994). Estrogen differentially regulates estrogen and nerve growth factor receptor mRNAs in adult sensory neurons. *J Neurosci.*, *14*, 459-471.
- Spiegel, D. (1991). Uses of hypnosis in managing medical symptoms. *Psychiatr.Med.*, *9*, 521-533.

- Steward, A. & Bayley, D. L. (1992). Effects of androgens in models of rheumatoid arthritis. *Agents Actions*, 35, 268-272.
- Stone, D. J., Song, Y., Anderson, C. P., Krohn, K. K., Finch, C. E., & Rozovsky, I. (1998). Bidirectional transcription regulation of glial fibrillary acidic protein by estradiol in vivo and in vitro. *Endocrinology*, 139, 3202-3209.
- Struble, R. G., Nathan, B. P., Cady, C., Cheng, X., & McAsey, M. (2007). Estradiol regulation of astroglia and apolipoprotein E: an important role in neuronal regeneration. *Exp. Gerontol.*, 42, 54-63.
- Sweitzer, S. M., Schubert, P., & DeLeo, J. A. (2001). Propentofylline, a glial modulating agent, exhibits antialloodynic properties in a rat model of neuropathic pain. *J Pharmacol. Exp. Ther.*, 297, 1210-1217.
- Talbot, J. D., Duncan, G. H., & Bushnell, M. C. (1989). Effects of diffuse noxious inhibitory controls (DNICs) on the sensory-discriminative dimension of pain perception. *Pain*, 36, 231-238.
- Temple, J. L. & Wray, S. (2005). Bovine serum albumin-estrogen compounds differentially alter gonadotropin-releasing hormone-1 neuronal activity. *Endocrinology*, 146, 558-563.
- Thomas, B. L. (1988). Self-esteem and life satisfaction. *J Gerontol. Nurs.*, 14, 25-30.
- Tsai, M. J. & O'Malley, B. W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.*, 63, 451-486.
- Tsao, C. M., Ho, C. M., Tsai, S. K., & Lee, T. Y. (1999). Effects of estrogen on autotomy in normal and ovariectomized rats. *Pharmacology*, 59, 142-148.
- Ulfenius, C., Linderöth, B., Meyerson, B. A., & Wallin, J. (2006). Spinal NMDA receptor phosphorylation correlates with the presence of neuropathic signs following peripheral nerve injury in the rat. *Neurosci. Lett.*, 399, 85-90.
- Unruh, A. M. (1996). Gender variations in clinical pain experience. *Pain*, 65, 123-167.

- VanderHorst, V. G., Schasfoort, F. C., Meijer, E., van Leeuwen, F. W., & Holstege, G. (1998). Estrogen receptor-alpha-immunoreactive neurons in the periaqueductal gray of the adult ovariectomized female cat. *Neurosci.Lett.*, *240*, 13-16.
- Velle, W. (1987). Sex differences in sensory functions. *Perspect.Biol.Med.*, *30*, 490-522.
- Walczak, J. S., Pichette, V., Leblond, F., Desbiens, K., & Beaulieu, P. (2006). Characterization of chronic constriction of the saphenous nerve, a model of neuropathic pain in mice showing rapid molecular and electrophysiological changes. *J Neurosci.Res.*, *83*, 1310-1322.
- Wall, P. D., Devor, M., Inbal, R., Scadding, J. W., Schonfeld, D., Seltzer, Z. et al. (1979). Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain*, *7*, 103-111.
- Watkins, L. R., Milligan, E. D., & Maier, S. F. (2001a). Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci.*, *24*, 450-455.
- Watkins, L. R., Milligan, E. D., & Maier, S. F. (2001b). Spinal cord glia: new players in pain. *Pain*, *93*, 201-205.
- Watkins, L. R., Milligan, E. D., & Maier, S. F. (2003). Glial proinflammatory cytokines mediate exaggerated pain states: implications for clinical pain. *Adv.Exp.Med.Biol.*, *521*, 1-21.
- Weiland, N. G. & Wise, P. M. (1990). Estrogen and progesterone regulate opiate receptor densities in multiple brain regions. *Endocrinology*, *126*, 804-808.
- Winkelstein, B. A. & DeLeo, J. A. (2002). Nerve root injury severity differentially modulates spinal glial activation in a rat lumbar radiculopathy model: considerations for persistent pain. *Brain Res.*, *956*, 294-301.
- Winkelstein, B. A., Rutkowski, M. D., Sweitzer, S. M., Pahl, J. L., & DeLeo, J. A. (2001). Nerve injury proximal or distal to the DRG induces similar spinal glial activation and selective cytokine

expression but differential behavioral responses to pharmacologic treatment. *J Comp Neurol.*, 439, 127-139.

Woolf, C. J. & Mannion, R. J. (1999). Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet*, 353, 1959-1964.

Woolf, C. J. & Salter, M. W. (2000). Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, 288, 1765-1769.

Yaksh, T. L. (1989). Behavioral and autonomic correlates of the tactile evoked allodynia produced by spinal glycine inhibition: effects of modulatory receptor systems and excitatory amino acid antagonists. *Pain*, 37, 111-123.

Zimmermann, M. (1991). Pathophysiological mechanisms of fibromyalgia. *Clin.J Pain*, 7 Suppl 1, S8-15.

Zimmermann, M. (2001). Pathobiology of neuropathic pain. *Eur.J Pharmacol.*, 429, 23-37.