

Université de Sherbrooke

**Effet analgésique d'agonistes neurotensinergiques dans un modèle de douleur neuropathique chez le rat**

Par  
Annie Guillemette  
Département de physiologie et biophysique

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.)  
en physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada  
Mars 2012

Membre du jury d'évaluation  
Dr. Philippe Sarret, département de physiologie et biophysique  
Dr. David Fortin, département de chirurgie  
Dr. Serge Marchand, département de chirurgie



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: 978-0-494-90987-4*

*Our file Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-90987-4*

#### 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.

#### 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.

---

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.

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

# **Effet analgésique d'agonistes neurotensinergiques dans un modèle de douleur neuropathique chez le rat**

Par

Annie Guillemette

Département de physiologie et biophysique

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M. Sc.) en physiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

La neurotensine est un peptide découvert de manière fortuite en 1973 (Carraway et al., 1973). Dans le système nerveux, on la retrouve dans les zones impliquées dans le contrôle de la douleur (Dobner, 2005). Lorsqu'elle est injectée en intrathécal et en supraspinal elle exerce un effet analgésique en douleur aiguë (Clineschmidt et al., 1977; Kalivas et al., 1982; Urban et al., 1993). Plus récemment, son effet analgésique en intrathécal dans un modèle de douleur tonique a été démontré (Roussy et al., 2008). Le mécanisme proposé pour cette analgésie est qu'elle initierait un contrôle inhibiteur descendant qui inhiberait la transmission des stimuli nociceptifs périphériques (Dobner, 2006). Jusqu'à maintenant, son effet n'a pas été étudié en douleur neuropathique.

La douleur neuropathique est une douleur chronique initiée ou causée par une lésion primaire du système nerveux. Plus 3.75 million d'Américains en sont atteints (Chong et al., 2003) et malheureusement, il existe un nombre limité de médicaments efficaces pour cette affliction. Il existe plusieurs modèles animaux de douleur neuropathique chez le rat. Le modèle le plus largement reconnu est le modèle de constriction chronique du nerf sciatique (Bennett et al., 1988).

À ce jour, 3 récepteurs lui ont été identifiés. NTR1 et NTR2 sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G et sont tous deux impliqués dans l'analgésie induite par la NT (Buhler et al., 2005). NTR3 est une protéine totalement différente possédant un seul domaine transmembranaire et dont le rôle n'est pas encore connu (Kitabgi, 2002).

Dans cette étude, nous avons utilisé le modèle de constriction chronique du sciatique chez le rat pour démontrer que la neurotensine ainsi que ses analogues peptidiques modifiés, NT69L et PD149163, à différentes doses exercent un effet analgésique en douleur neuropathique. La douleur a été quantifiée par le test de von Frey électronique automatique et le test plantaire. Le PD149163 est un agoniste spécifique du récepteur NTR1 et il a provoqué un effet analgésique marqué. Ces résultats démontrent donc pour la première fois l'implication du récepteur NTR1 dans l'inhibition de la douleur d'origine neuropathique.

**Mots-clés :** neurotensine, analgésie, douleur neuropathique, rat, récepteur NTR1

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES TABLEAUX	v
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	vii
<b>1.0 INTRODUCTION SUR LA DOULEUR</b>	<b>1</b>
1.1 Définition douleur et nociception	1
1.2 Physiologie de la nociception	1
1.3 Terminologie	6
<b>2.0 DOULEUR NEUROPATHIQUE</b>	<b>8</b>
2.1 Épidémiologie	8
2.2 Manifestations cliniques	10
2.3 Tests sensoriels de douleur neuropathique évoquée	11
2.4 Physiopathologie de la douleur neuropathique	12
2.5 Traitements pharmacologiques de la douleur neuropathique	15
<b>3.0 MODÈLES EXPÉRIMENTAUX DE DOULEUR NEUROPATHIQUE CHEZ LE RAT</b>	<b>18</b>
3.1 Constriction chronique du sciatique (CCI)	19
3.2 Ligature partielle du nerf saphène (SPL)	21
<b>4.0 TESTS COMPORTEMENTAUX DE DOULEUR</b>	<b>22</b>
4.1 Test de von Frey	22
4.2 Test plantaire ou méthode de Hargreaves	23
<b>5.0 INJECTION INTRATHÉCALE (IT) CHEZ LE RAT</b>	<b>25</b>
<b>6.0 ANESTHÉSIE CHEZ LE RAT</b>	<b>26</b>
<b>7.0 NEUROTENSINE (NT)</b>	<b>27</b>
7.1 Découverte	27
7.2 Structure	27
7.3 Synthèse	27
7.4 Dégradation	28
7.5 Localisation de la NT dans le système nerveux	28
<b>8.0 RÉCEPTEURS DE LA NT (NTR)</b>	<b>29</b>
8.1 Récepteur à haute affinité: NTR1	29

8.2	Récepteur à faible affinité : NTR2	30
8.3	NTR3	31
9.0	EFFETS DE LA NT	31
9.1	Effet périphérique de la NT	32
9.2	Effets centraux de la NT	32
10.0	ANALOGUES NEUROTENSINERGIQUES	36
11.0	AGONISTES NEUROTENSINERGIQUES ET DOULEUR NEUROPATHIQUE	37
	OBJECTIFS DU PROJET	39
	Avant-propos de l'article	40
	Résumé de l'article en français	41
	ARTICLE	42
12.0	DISCUSSION	74
12.1	Choix du modèle	74
12.2	Modifications au modèle	75
12.3	Choix du contrôle, effets controlatéraux et effet de la procédure sham	75
12.4	Effets de la chirurgie	76
12.5	Effet analgésique des agonistes neurotensinergiques	77
12.6	Autres effets observés	79
12.7	Efficacité des agonistes neurotensinergiques en comparaison à des médicaments efficaces cliniquement en douleur neuropathique	80
13.0	CONCLUSION ET PERSPECTIVE	80
	ANNEXE 1	83
	REMERCIEMENTS	84
	LISTE DES RÉFÉRENCES	86

**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1	Analyse d'un échantillon aléatoire de la base de données de la RAMQ sur les patients souffrant de douleur neuropathique.....	9
-----------	--	---

**LISTE DES FIGURES**

Figure 1	Différents types de fibres sensibles.....	4
Figure 2	Voies ascendantes.....	4
Figure 3	Différentes couches de matière grise dans la moelle épinière.....	5
Figure 4	Théorie du Portillon.....	5
Figure 5	Contrôles inhibiteurs issus du tronc cérébral.....	6
Figure 6	Terminologie de la douleur.....	7
Figure 7	Allodynie et hyperalgésie.....	11
Figure 8	Le thermostimulateur : Thermode de Peltier.....	12
Figure 9	Constriction chronique du sciatique.....	19
Figure 10	Nerf sciatique et saphène chez le rat.....	21
Figure 11	Von Frey électronique automatique.....	22
Figure 12	Test plantaire ou méthode de Hargreaves.....	24
Figure 13	Injection intrathécale chez le rat.....	26
Figure 14	Séquence de la neurotensine.....	27
Figure 15	Récepteurs de la neurotensine.....	31
Figure 16	Hypothèse du mécanisme de modulation de la douleur par le système neurotensinergique.....	36

**LISTE DES ABBRÉVIATIONS**

AD	Antidépresseur
AED	Antiépileptique
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
ATP	Adénosine triphosphate
ATPs	Antipsychotique
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CCI	Constriction chronique du sciatique
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
CIDN	Contrôles inhibiteurs descendants déclenchés par stimulation nociceptive
DA	Dopamine
DRG	Ganglion(s) rachidien(s) dorsal(aux)
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
5-HT	Sérotonine
IASP	Association Internationale pour l'Étude de la Douleur
IP <sub>3</sub>	Inositol triphosphate
ISCS	Inhibiteur sélectif du captage de la sérotonine
ICSN	Inhibiteur du captage de la sérotonine et de la noradrénaline
IC	Intracérébral
ICV	Intracérébroventriculaire
IT	Intrathécal
iv	Intraveineux
LCR	Liquide céphalorachidien
NA	Noradrénaline
NMDA	N-méthyl-D-Aspartate
NN	Neuromédine
NT	Neurotensine
NTR	Récepteur de la neurotensine
PA	Potentiel d'action
RAMQ	Régie d'assurance maladie du Québec

SGPA	Substance grise périaqueducale
SN	Système nerveux
SNC	Système nerveux central
SNI	Épargne du nerf sural
SNP	Système nerveux périphérique
SP	Substance P
SPL	Ligature partielle du nerf saphène

## INTRODUCTION

### 1.0 INTRODUCTION SUR LA DOULEUR

#### 1.1 Définition douleur et nociception

La douleur est définie par L'Association Internationale pour l'Étude de la Douleur (IASP) comme étant une sensation désagréable et une expérience émotionnelle en réponse à une atteinte tissulaire réelle ou potentielle (Guirimand et al., 1996). La nociception (du latin nocere : nuire) quant à elle réfère à la détection et à la transmission du stimulus douloureux vers le cerveau.

#### 1.2 Physiologie de la nociception

La nociception est constituée de 3 processus :

**Transduction** : Activation des nocicepteurs par un stimulus douloureux, mécanique, chimique ou thermique et transformation de ce signal en activité électrique.

Les nocicepteurs sont les terminaisons libres amyéliniques de fibres sensibles disposées en arborisations dans les tissus cutanés, musculaires, articulaires, osseux et viscéraux. Deux types de fibres sensibles véhiculent l'information nociceptive. Elles sont classées selon leur diamètre et la présence ou non d'une gaine de myéline (Figure 1). Les fibres A $\delta$ , faiblement myélinisées, transportent l'influx nerveux à vitesse moyenne. Les fibres C, non myélinisées, conduisent l'influx lentement (Guirimand et al., 1996).

**Transmission** : Propagation de l'influx dans le système sensitif (Figure 2 et 3).

L'influx voyage par la fibre sensitive appelée neurone de 1<sup>er</sup> ordre. Ce dernier est constitué d'une branche périphérique (nocicepteur), d'un corps cellulaire situé dans le ganglion rachidien et d'une branche centrale qui pénètre la moelle via la racine postérieure. Cette dernière fait synapse avec un neurone de 2<sup>e</sup> ordre dans la corne postérieure, essentiellement dans la couche superficielle I (Guirimand et al., 1996). Pas moins d'une vingtaine de

substances sont potentiellement libérées à ce niveau : outre l'adénosine triphosphate (ATP), ces substances sont classées en deux groupes : les acides aminés excitateurs [glutamate] et les peptides [ex. substance P, somatostatine, enképhaline, etc.] (Guirimand et al., 1996).

Le neurone de 2<sup>e</sup> ordre croise la ligne médiane par la commissure grise antérieure et gagne, sur une distance de 2 à 3 segments spinaux, le faisceau spinothalamique et spinoréticulaire dans le quadrant antérolatéral controlatéral de la moelle. Le neurone de 2<sup>e</sup> ordre se projette au noyau ventral postérolatéral du thalamus latéral. Les noyaux du thalamus latéral émettent des projections vers le cortex somatosensoriel primaire qui est impliqué dans la composante sensoridiscriminative de la douleur. Le faisceau spinoréticulaire se termine dans les noyaux de la formation réticulée. La voie spinoréticulaire interviendrait dans l'élaboration de réactions motrices et émotionnelles liées à la douleur (Guirimand et al., 1996).

**Modulation** : Modification des transmissions nociceptives par de multiples influences inhibitrices ou facilitatrices. Entre un stimulus périphérique et la sensation de douleur, des mécanismes de contrôles spinaux et centraux modulent la transmission du message (Guirimand et al., 1996).

#### **Contrôles organisés à l'étage médullaire ou Théorie du Portillon (Figure 4)**

La théorie du Portillon fut postulée par Melzack et Wall en 1965. Selon cette théorie, un interneurone inhibiteur dans la corne postérieure de la moelle épinière agit comme un portillon, contrôlant l'accès des messages douloureux au neurone de 2<sup>e</sup> ordre et donc, au cerveau, affectant ainsi la perception de la douleur. Les fibres A $\alpha$  et A $\beta$  sont des fibres myélinisées de gros calibres permettant la perception du sens de position du corps et le toucher discriminatif. Lorsque stimulées par exemple, par un neurostimulateur électrique transcutané (TENS), ces fibres stimulent l'interneurone, inhibant ainsi la transmission de la douleur. Lorsque inhibé par les fibres A $\delta$  et C, l'interneurone n'exerce plus son effet inhibiteur (Melzack et al., 1965). « La transmission des messages nociceptifs est réglée par un effet de balance entre ces diverses influences, la douleur ne survenant que lorsqu'il y a rupture d'équilibre en faveur des messages excitateurs, soit par « excès de nociception », soit par déficit des contrôles inhibiteurs. » (Guirimand et al., 1996).

### **Contrôles médullaires d'origine supraspinale**

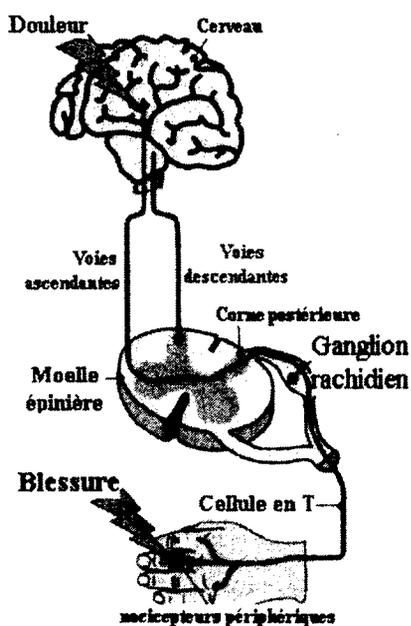
*Contrôles inhibiteurs descendants déclenchés par les stimulations cérébrales* : La SGPA reçoit des afférences du cortex, de l'hypothalamus et de l'amygdale et inhibe la transmission de la douleur via un relais à une région de la jonction pontomédullaire dénommée région bulbaire rostroventrale. Cette région contient des neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé qui se projettent massivement vers la moelle postérieure. Ce système est activé en réponse à une variété de stress aigus suggérant que la modulation centrale constitue une réponse d'adaptation importante aux stress environnementaux (Lewis et al., 1980). Mis à part le système sérotoninergique, d'autres systèmes descendants dopaminergiques, opioïdiques, noradrénergiques et neurotensinergiques seraient également impliqués (Dobner, 2006; Guirimand et al., 1996) (Figure 5).

Contrôles inhibiteurs descendants déclenchés par stimulation nociceptive (CIDN) : L'application d'un second stimulus douloureux sur n'importe quelle région du corps excluant celle d'un premier stimulus, à condition que le second stimulus soit au-delà d'une certaine intensité, durée et surface critique, entraîne une diminution de l'intensité du premier stimulus via le déclenchement des CIDN. Ils sont sous-tendus par une boucle spino-bulbo-spinale dont les afférences empruntent le faisceau spinoréticulaire et les efférences impliquent une partie très caudale du bulbe et des projections très diffuses sur les neurones à convergences spinaux et trigéminaux. Il existe au moins un relais opioïdique dans cette boucle (Guirimand et al., 1996).

Axonés sensoriels	A $\alpha$	A $\beta$	A $\delta$	C
Axonés des fibres sensorielles musculaires	Groupe I	II	III	IV
Diámetro (µm)	13 - 20	6 - 12	1 - 5	0.2 - 1.5
Vitesse (m/s)	80 - 120	35 - 75	5 - 30	0.5 - 2
Recepteurs sensoriels	Propriocepteurs des muscles squelettiques	Mécanorecepteurs de la peau	Douleur température	Température douleur démangeaison

**Figure 1 : Différents types de fibres sensibles.**

Les fibres A $\alpha$  et A $\beta$  possèdent une importante gaine de myéline et conduisent l'influx nerveux rapidement. Elles sont responsables des sensations proprioceptives et tactiles. Les fibres A $\delta$  peu myélinisées conduisent l'influx à vitesse moyenne et les fibres C non myélinisées conduisent l'influx lentement. Ces dernières transmettent les sensations douloureuses et thermiques.

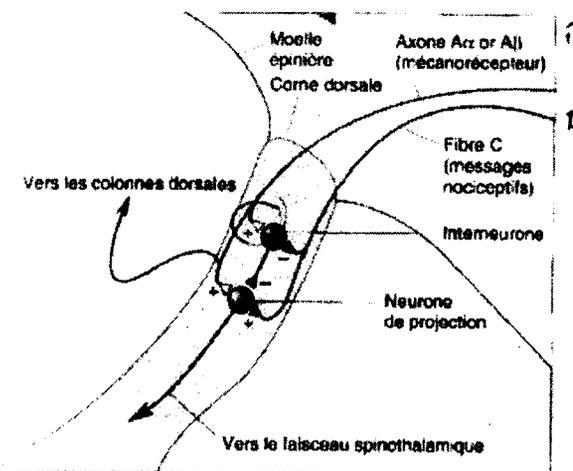


**Figure 2 : Voies ascendantes nociceptives.**



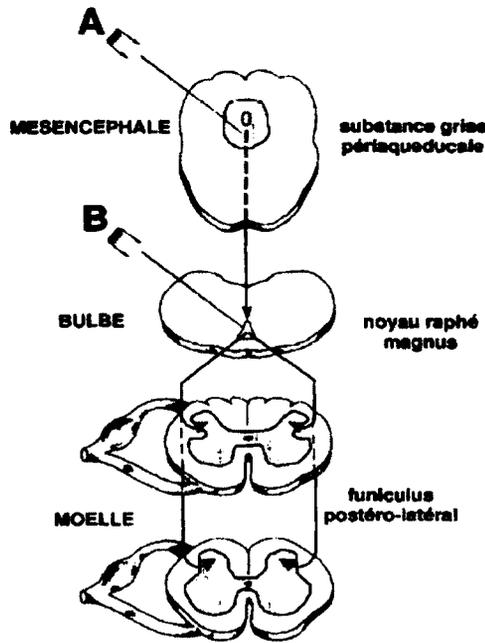
**Figure 3 : Les différentes couches de matière grise dans la moelle épinière.**

Il y a 10 couches aux fonctions différentes. Les couches I et II constituent les couches superficielles de la corne dorsale et sont la cible principale des fibres afférentes.



**Figure 4 : Théorie du Portillon.**

Le neurone de 2<sup>e</sup> ordre stimule la transmission de la douleur, son activité est inhibée par l'interneurone. L'activité de l'interneurone est stimulée par les grosses fibres Aα et Aβ et inhibée par les nocicepteurs Aδ et C.



**Figure 5 : Contrôles inhibiteurs issus du tronc cérébral.**

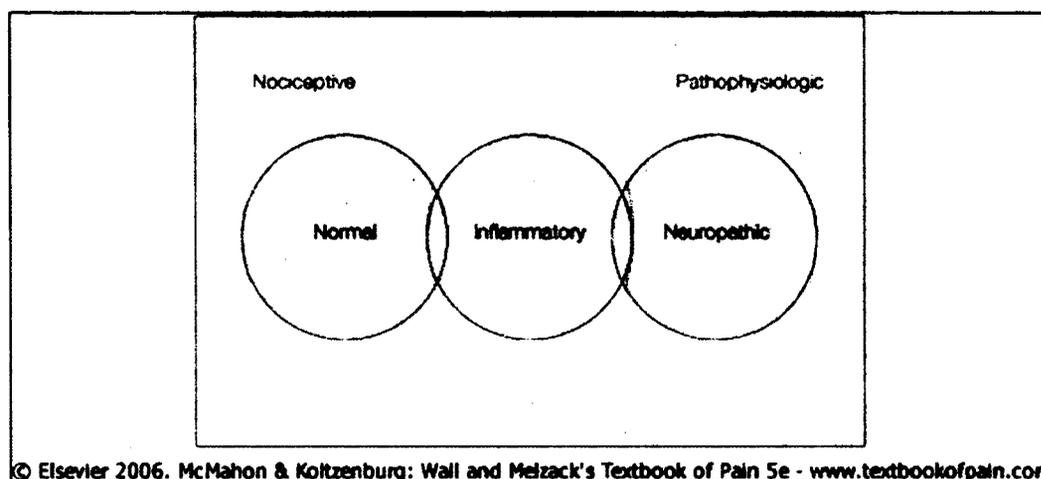
La stimulation électrique de la substance grise périaqueducale (A) provoque l'activation des contrôle inhibiteurs descendants bulbaire (B) qui cheminent dans les faisceaux postérolatéraux de la matière blanche pour inhiber les neurones de la corne dorsale impliqués dans la transmission des messages nociceptifs vers les centres supérieurs (adapté de Guirimand et al., 1996).

### 1.3 Terminologie

**Douleur physiologique :** Nous ressentons de la douleur lorsque les signaux provenant de l'activation des nocicepteurs parviennent au cerveau. La sensation correspond alors au stimulus (McMahon et al., 2006). La douleur signale un stimulus qui requiert une attention immédiate.

**Douleur inflammatoire :** Suite à une blessure, une réaction inflammatoire se crée. Le but premier de l'inflammation est de combattre l'infection et de réparer les tissus lésés à l'aide de cellules et de médiateurs inflammatoires. Cette soupe inflammatoire stimule chimiquement les nocicepteurs et réduit leurs seuils d'activation aux stimuli. C'est ce qui est appelé **sensibilisation périphérique** (Figure 6). Ici, la sensation ne correspond plus au stimulus (McMahon et al., 2006).

**Douleur neuropathique :** La douleur physiologique et la douleur inflammatoire sont des signaux d'alarme, leur rôle est de nous signaler un dommage potentiel ou actuel, alors que la douleur neuropathique représente la conséquence d'un processus anormal de l'information dans les voies nociceptives et est pathologique (Figure 6). Elle est définie par l'IASP comme étant une douleur initiée ou causée par une lésion primaire ou une dysfonction du système nerveux central (SNC) ou périphérique (SNP) (Merskey et al., 1994). Elle est chronique ou chronique en devenir.



**Figure 6 : Terminologie de la douleur.**

Nous pouvons constater qu'il existe un chevauchement entre les différents termes et entre la normalité et la pathologie.

**Douleur aiguë vs chronique :** Souvent, le terme douleur aiguë est assimilé aux termes douleur physiologique, normale ou nociceptive. Pourtant, ce terme réfère simplement au caractère temporel de la douleur. Une douleur qui persiste plus de 3 mois est, par définition, chronique (Arnstein, 2004). Cet état d'alarme persistant devient alors délétère pour l'organisme car la douleur chronique s'accompagne de changements neurophysiologiques, psychologiques, comportementaux et sociaux qui perturbent tous les aspects de la vie de l'individu touché et de ses proches (Harden, 2005; Néron, 2005).

## **2.0 DOULEUR NEUROPATHIQUE**

### **2.1 Épidémiologie**

Il est difficile de donner des statistiques puisqu'il n'y a pas de bonnes études épidémiologiques sur le sujet. Approximativement 3.75 millions d'Américains seraient atteints de douleur neuropathique, ce qui représente 1.5% de leur population (Chong et al., 2003; Harden, 2005). Une analyse récente d'un échantillon aléatoire de patients couverts par la Régie de l'assurance maladie du Québec (RAMQ) a démontré que l'âge moyen des patients atteints de douleur neuropathique est de 57 ans et que les femmes sont davantage touchées dans un rapport 3 pour 2 (Lachaine et al., 2007). Selon cette même étude, les étiologies de douleur neuropathique les plus fréquentes sont le syndrome de douleur régionale complexe (28.6%), le tunnel carpien (25.4%), la lombalgie chronique (24.3%) et finalement les mononévrites des membres supérieurs (Tableau 1). Les comorbidités associées sont nombreuses ; environ 60% des patients rapportent des troubles du sommeil, le tiers des troubles dépressifs et le quart des troubles anxieux. La douleur a plus de chance de persister s'il y a dépression et l'inverse est également vrai (McMahon et al., 2006). L'utilisation des services de santé et les coûts sociétaux conséquemment engendrés sont élevés chez les gens souffrants de ce type de douleur (Lachaine et al., 2007).

<b>Caractéristiques des patients</b>	
<b>Âge (ans)</b>	<b>%</b>
< 40	16.8
40-59	33.8
60-74	32.2
<b>Âge moyen</b>	<b>57.4 ans</b>
<b>Sexe</b>	<b>%</b>
♀	61.4
♂	38.6
<b>Étiologies</b>	<b>%</b>
Syndrome douloureux régional complexe	28.6
Tunnel carpien	25.4
Lombalgie chronique	24.3
Mononévrite des membres supérieurs	17.5
Cervicalgie chronique	2.2
Névralgie du trijumeau	1.0
Douleur faciale atypique	0.5
Autres	3.0

**Tableau 1 : Analyse d'un échantillon aléatoire de la base de données de la RAMQ sur les patients souffrant de douleur neuropathique.**

Adapté de Lachaine et al., 2007

## 2.2 Manifestations cliniques

La douleur neuropathique résulte d'une lésion du SN et ce dernier est constitué de 3 systèmes longitudinaux aux fonctions spécifiques; le système sensitif, le système moteur et le système autonome. Une lésion du SN entraînant une douleur neuropathique peut également entraîner des signes et symptômes du système moteur (ex. paralysie) et/ou autonome (ex. perte de sudation).

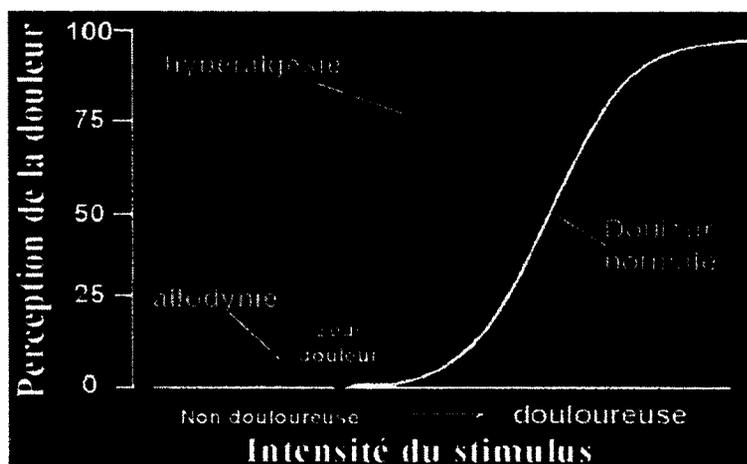
Une lésion du système sensitif peut s'accompagner de phénomènes négatifs et/ou positifs. Un phénomène négatif est une perte partielle (hypoesthésie) ou complète (anesthésie) de la sensibilité tactile, thermique, douloureuse. Un phénomène positif constitue un gain de fonction qui est anormal, c'est ce qui constitue la douleur neuropathique. Par exemple; ressentir un fourmillement (paresthésie) ou un choc électrique (dysesthésie) de manière spontanée ou lors d'un effleurement de la peau. Il existe 2 types de douleur neuropathique :

La **douleur évoquée** (secondaire à un stimulus) est caractérisée par de l'hyperalgésie et de l'allodynie. L'*hyperalgésie* c'est lorsqu'un stimulus douloureux entraîne une réponse exagérément douloureuse. L'*allodynie* c'est lorsqu'un stimulus non douloureux entraîne de la douleur (Figure 7). Elle peut être secondaire à un stimulus mécanique, thermique ou chimique.

La **douleur spontanée** (survient sans stimulus) peut être constante ou intermittente. Elle est souvent décrite comme une sensation de brûlure, de choc électrique, etc.

Les *paresthésies* sont des sensations anormales non douloureuses comme des picotements ou fourmillements tandis que les *dysesthésies* sont des sensations anormales désagréables ou douloureuses. Elles peuvent être **spontanées ou évoquées**.

La plupart du temps, ces 2 types de douleur sont retrouvés chez un même sujet. La localisation de la douleur est dépendante de l'endroit de la lésion nerveuse (Dworkin et al., 2003; Harden, 2005; McMahon et al., 2006).



**Figure 7 : Allodynie et hyperalgésie.**

### 2.3 Tests sensoriels de douleur neuropathique évoquée

Les tests sensoriels quantitatifs sont utilisés dans le cadre de la recherche clinique chez l'humain. Ils établissent un parallèle avec les tests qui sont employés pour tester la douleur neuropathique chez le rat. Ces tests sont dits psychophysiques; ils sont quantitatifs mais subjectifs. Le sujet étudié doit être concentré et coopératif. Malgré cela, une variabilité intrasujet existe mais pour le moment, ce sont les seuls tests quantitatifs qui mesurent l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique chez l'humain (McMahon et al., 2006).

Le *Test de stimulation thermique* (Figure 8), aussi appelé thermode, est utilisé pour mesurer l'**hyperalgésie thermique**. Ils existent en diverses dimensions selon l'utilisation anatomique. Une thermode se refroidit ou se réchauffe de manière linéaire (1°C/s) selon la direction d'application d'un courant électrique. Sa température de base est établie à 30°C, des valeurs minimales et maximales sont aussi établies. L'instrument est appliqué sur une surface de peau saine et propre et il est actionné manuellement. Diverses façons de tester existent mais le but commun est de détecter le seuil de douleur au froid ou à la chaleur. Chez l'humain en bonne santé le seuil de douleur au chaud se situe aux alentours de 45°C et le seuil de douleur au froid aux alentours de 14°C. Un sujet hyperalgésique à la chaleur ressentira de la douleur à des températures moins élevées et un sujet hyperalgésique au

froid à des températures plus élevées que chez des sujets sains (Jaaskelainen, 2004; McMahon et al., 2006).

Les *Poils de von Frey* ou l'*algomètre* sont 2 instruments utilisés pour mesurer l'allodynie mécanique.



**Figure 8 : Le thermostimulateur : Thermode de Peltier.**

Différentes dimensions existent selon l'utilisation requise car peut être appliqué à diverses régions anatomiques.

#### **2.4 Physiopathologie de la douleur neuropathique**

Le développement, dans les 2 dernières décennies, de modèles expérimentaux animaux de douleur neuropathique et de nouvelles technologies a permis l'émergence d'une panoplie d'hypothèses quant aux mécanismes sous-tendant la douleur neuropathique. Selon les connaissances physiopathologiques actuelles, la douleur neuropathique regroupe un ensemble de changements cellulaires et moléculaires dans les voies nociceptives survenant suite à un dommage neural et résultant en un état d'hyperexcitabilité et de perte d'inhibition. Le dommage neural peut se situer au niveau des terminaisons nerveuses ou au niveau de l'axone (Bennett, 2003; McMahon et al., 2006). Les différents mécanismes du développement de la douleur neuropathique peuvent être regroupés en 3 catégories : la **sensibilisation périphérique**, la **sensibilisation centrale** et la **perte d'inhibition**.

La *sensibilisation périphérique* réfère à un état d'**hyperexcitabilité** des fibres afférentes (Dworkin et al., 2003). L'hyperexcitabilité signifie une plus grande capacité à générer des potentiels d'action (PA). Elle survient suite à divers mécanismes :

*Médiateurs inflammatoires et facilitation de l'excitabilité* : Lors d'un dommage neural, il y a de l'inflammation. Les médiateurs inflammatoires abaissent le seuil d'activation des nocicepteurs via une augmentation de l'activité des canaux sodiques. En fait, ils augmentent le courant ionique pouvant passer à travers ces canaux (Baker et al., 2001; McMahon et al., 2006). De plus, certains de ces médiateurs peuvent favoriser l'insertion de canaux sodiques latents, normalement non disponibles, contenus dans des vésicules du cytoplasme du neurone. Ces 2 phénomènes peuvent survenir tant au niveau des fibres lésées que des fibres adjacentes saines et sont responsables de l'**hyperalgésie** (McMahon et al., 2006).

*Processus de réparation et activité électrique ectopique* : Dans les conditions physiologiques, ce n'est que l'extrémité de la fibre qui peut générer des PA. Lors d'un dommage nerveux, un ensemble de mécanismes ayant pour but la réparation du tissu sont mis en place et ces processus de réparation ne sont pas parfaits. Dans une fibre lésée et dans les fibres adjacentes saines, il y a de l'activité électrique ectopique. Les fibres A, les fibres C ainsi que leurs corps cellulaires peuvent subir ces changements. Cette capacité 'pacemaker' nouvelle est en grande partie attribuable à l'acquisition de certains canaux sodiques normalement peu exprimés dans les fibres afférentes et leur corps cellulaire. L'activité ectopique peut être spontanée ou évoquée, elle est la cause des **paresthésies** et des **dysesthésies** (Baker et al., 2001; McMahon et al., 2006).

### ***Sensibilisation centrale***

Lorsque stimulé constamment par la périphérie, le SNC, particulièrement la moelle, peut devenir hyperexcitable. Le transfert synaptique est alors augmenté, potentialisé et facilité. De plus, le SNC peut subir des changements de modalité (plasticité) et interpréter de manière erronée l'information périphérique. Plusieurs mécanismes menant à la sensibilisation centrale ont été découverts :

### ***Wind-up***

Le 'wind-up' c'est lorsque des décharges répétées des nocicepteurs mènent à une augmentation progressive de l'excitation des neurones de 2<sup>e</sup> ordre. Les décharges répétées entraînent un influx calcique présynaptique plus important ce qui mène à la relâche de neuropeptides excitateurs, substance P (SP) et calcitonin gene-related peptide (CGRP), en plus du glutamate normalement relâché. La SP et le CGRP activent des récepteurs couplés aux protéines G sur la membrane post-synaptique et cela a pour effet de la dépolariser. Cette dépolarisation lève l'inhibition voltage dépendante du magnésium sur les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA). Le récepteur NMDA est un récepteur-canal qui s'ouvre lors de la fixation du glutamate et laisse entrer les ions Na<sup>+</sup> et surtout Ca<sup>2+</sup>. Ces influx augmentent la dépolarisation. Ces 2 types de dépolarisations s'additionnent et entraînent l'activation des canaux calciques voltage dépendants. Le résultat est une augmentation de l'excitation des neurones de 2<sup>e</sup> ordre. Le wind-up est un changement à court terme, il est totalement dépendant de la stimulation (McMahon et al., 2006).

### ***Plasticité homosynaptique et hétérosynaptique***

Suite à un stimulus douloureux intense, un ensemble de phénomènes peut se produire affectant les neurones de la corne dorsale ayant été touchés par le stimulus conditionnant (plasticité homosynaptique) mais aussi, des neurones n'ayant pas été touchés par le stimulus conditionnant (plasticité hétérosynaptique). C'est ainsi que des fibres afférentes A $\beta$ , activées par des stimuli tactiles non douloureux, peuvent stimuler des neurones de la corne dorsale normalement activés que par des nocicepteurs. C'est ce qui entraîne l'**allodynie**. La plasticité est la conséquence de 2 changements majeurs se produisant suite à la libération de neurotransmetteurs (ex. glutamate) et de neuromodulateurs (ex. substance

P, facteur neurotrophique dérivé du cerveau) excitateurs dans la fente synaptique par la fibre afférente ainsi que par les cellules gliales activées de la corne postérieure:

- ◆ modifications post-transcriptionnelle des canaux ioniques et des récepteurs ainsi que des voies de signalisation et protéines régulatrices associées
- ◆ trafic de canaux ioniques dans la fibre afférente et dans la corne postérieure suite au trafic de récepteurs à la membrane

Les influx calciques à travers le récepteur NMDA sont majoritairement impliqués dans cette plasticité (McMahon et al., 2006).

### ***Perte d'inhibition***

Dans les paragraphes précédents, l'état d'hyperexcitabilité retrouvée dans la sensibilisation périphérique et centrale a été abordé. Mais, la perte d'inhibition est d'une tout aussi grande importance pour le développement de la douleur neuropathique. Comme nous l'avons vu, la transmission d'information sensorielle du SNP au SNC est soumise à des contrôles inhibiteurs périphériques, spinaux et supraspinaux au niveau pré et postsynaptique. Plusieurs travaux ont démontré une perte d'inhibition à tous les niveaux chez des modèles animaux de douleur neuropathique (Devor, 1988; Laird et al., 1992; Wall et al., 1981). Tout d'abord, il y a une baisse de la stimulation des interneurons inhibiteurs GABAergiques par les fibres A $\alpha$  et A $\beta$ . Deuxièmement, il y a une perte de ces derniers qui pourrait être dû à l'effet neurotoxique de l'état d'hyperexcitabilité prolongé. Troisièmement, il y a un changement de la réponse post-synaptique d'hyperpolarisation au GABA dû à la perte de co-transporteurs K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> (McMahon et al., 2006).

## **2.5 Traitements pharmacologiques de la douleur neuropathique**

Par opposition aux progrès substantiels effectués au niveau de la physiopathologie de la douleur neuropathique, les progrès au niveau du traitement de cette condition ont été plus lents (Bennett, 2003). Il existe un nombre limité de traitements efficaces et ceux-ci procurent un traitement symptomatique seulement. Les médications les plus efficaces

procurent un soulagement satisfaisant, c'est-à-dire un soulagement de 50% et plus de l'intensité de la douleur, seulement chez 50% des utilisateurs. En pratique, des combinaisons de traitement doivent souvent être utilisées devant l'inefficacité d'un seul médicament. Toutefois, cela se fait généralement au prix d'une augmentation des effets secondaires indésirables et des interactions médicamenteuses. Globalement, nous pouvons classer les traitements en 3 catégories;

### ***Modulateurs de la sensibilisation périphérique***

Cette catégorie regroupe une variété d'antiépileptiques (AED), d'antiarythmiques et d'analgésiques topiques ayant la propriété de bloquer les canaux sodiques voltage dépendants de manière non spécifique. La concentration de médicament nécessaire pour bloquer l'activité ectopique est de 2 à 3 fois plus faible que celle nécessaire pour bloquer l'activité électrique normale du système nerveux ou du système cardiovasculaire. L'activité électrique ectopique est ainsi bloquée sans toutefois bloquer l'activité électrique normale. Cette fenêtre thérapeutique est essentielle, cependant, dans un contexte clinique, le risque de toxicité est tout de même bien présent. Les AED agissant selon ce mécanisme sont la carbamazépine, l'oxcarbazépine et le lamotrigine. Parmi les antiarythmiques, il y a la mexilétine et la lidocaïne topique qui est utilisée dans certaines pathologies (névralgie post-herpétique). Les AD tricycliques agissent aussi en partie selon ce mécanisme.

### ***Modulateurs de la sensibilisation centrale***

Tout d'abord, rappelons que la sensibilisation centrale est, en grande partie, initiée par l'activité électrique ectopique et donc, en supprimant celle-ci, la sensibilisation centrale sera réduite. Dans cette catégorie, nous retrouvons les bloqueurs des canaux calciques voltage-dépendants tels que la gabapentine et la prégabaline et les antagonistes des récepteurs glutamate de type NMDA comme la kétamine topique et le dextrométorphan (Beniczky et al., 2005; McMahon et al., 2006).

### ***Modulateurs des voies inhibitrices***

Ce sont les AD, les opiacés et l'analgésique atypique tramadol. Les AD tricycliques sont les premiers à avoir été reconnus comme efficaces dans les études randomisées contrôlées.

En plus de bloquer les canaux sodiques voltage-dépendants, ils inhibent le captage de la noradrénaline (NA) et de la sérotonine (5-HT), augmentant ainsi leur concentration au niveau des synapses. Ils sont efficaces dans une grande variété d'étiologies de douleur neuropathique. Par contre, ils ont un profil d'effets secondaires peu favorable, surtout chez la personne âgée. Les nouveaux AD sont mieux tolérés mais généralement moins efficaces que les tricycliques. Parmi eux, les inhibiteurs sélectifs du captage de la sérotonine (ISCS), tel que la fluoxétine et les inhibiteurs du captage de la sérotonine et de la noradrénaline (ICSN), tel que venlafaxine et la duloxétine.

Les opiacés ont été un sujet de controverse en douleur neuropathique mais les évidences de leur efficacité sont présentes. Ils inhibent la transmission d'information nociceptive en se liant à leurs récepteurs opioïdiques localisés sur la membrane présynaptique des afférences primaires, postsynaptique des neurones de 2<sup>e</sup> ordre et sur les interneurons inhibiteurs de la couche II de la substance grise. Le tramadol est un analgésique atypique, il inhibe faiblement le captage de la NA et de la 5-HT et un de ses métabolites primaires est un agoniste des récepteurs opioïdiques  $\mu$  (Beniczky et al., 2005; McMahon et al., 2006).

### *Effets secondaires*

Les effets secondaires sont fréquents et nombreux dans le traitement de la douleur neuropathique. Les gens souffrant de douleur neuropathique sont souvent âgés, ont plusieurs comorbidités et donc, consomment plusieurs autres médicaments. Cela a pour effet de multiplier les chances d'effets secondaires et d'interactions médicamenteuses. Parmi les AED, la carbamazépine entraîne de la sédation, de l'ataxie et peut être compliqué de problèmes hématologiques graves. L'oxcarbazépine peut entraîner de la sédation, de l'ataxie et peut se compliquer d'hyponatrémie sévère. Les AED sont reconnus comme ayant plusieurs interactions médicamenteuses surtout via leurs effets sur le système enzymatique hépatique des cytochromes p450.

Particulièrement chez la personne âgée, les AD tricycliques sont souvent accompagnés, d'effets anticholinergiques soit des troubles cognitifs et de l'hypotension orthostatique.

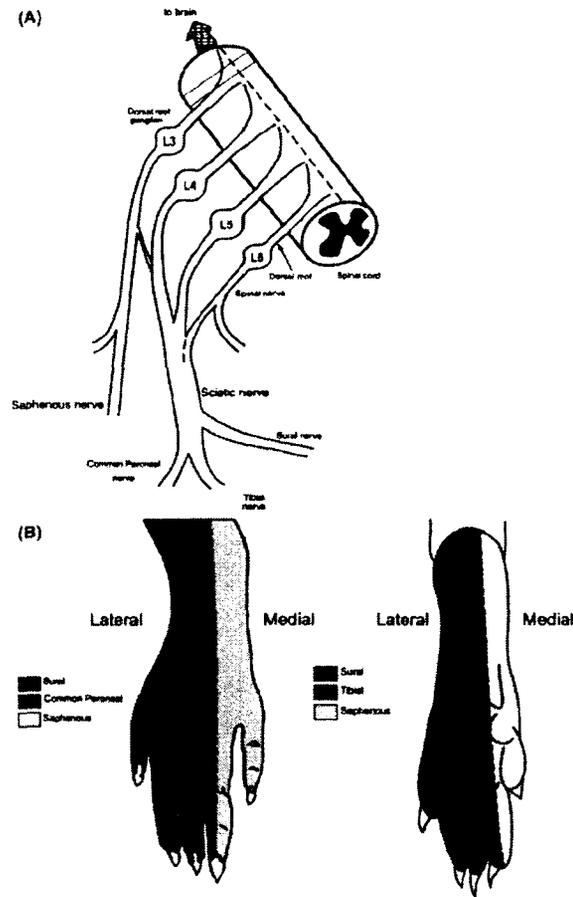
Les opiacés entraînent des nausées, de la constipation, de la sédation et des troubles cognitifs, et peuvent entraîner une tolérance ainsi qu'une dépendance (Beniczky et al., 2005; McMahon et al., 2006).

### 3.0 MODÈLES EXPÉRIMENTAUX DE DOULEUR NEUROPATHIQUE CHEZ LE RAT

Le 1<sup>er</sup> modèle animal de douleur neuropathique fut rapporté en 1979 (Wall et al., 1979). Allait apparaître, dans les années subséquentes, plus de 30 modèles animaux de douleur neuropathique, surtout chez le rat, la plupart basés sur la production d'une lésion d'un nerf périphérique (principalement le sciatique) par un trauma physique ou chimique (McMahon et al., 2006; Ueda, 2006). Ces modèles tentent de reproduire les neuropathies périphériques retrouvées chez l'humain. Ils ont été et sont toujours très utiles pour comprendre les mécanismes physiopathologiques sous-tendant la douleur neuropathique ainsi que pour tester de nouveaux traitements pharmacologiques. De manière plus détaillée, nous discuterons du modèle de constriction chronique du nerf sciatique puisque celui-ci fut utilisé dans le cadre de ce projet de maîtrise. Nous aborderons également le modèle de ligature partielle du saphène puisqu'il est nouvellement décrit (Bennett et al., 1988; Walczak et al., 2005).

Chez le rat, le **nerf sciatique** est constitué de la convergence des racines L4 à L6. Il se divise en 3 nerfs à la mi-cuisse: le **nerf tibial**, **péronier commun** et **sural**. Le nerf sciatique et ses branches innervent tous les muscles de la patte et donnent la sensibilité à la portion centrolatérale de la face dorsale et plantaire des pattes arrières.

Le **nerf saphène** est une division cutanée terminale du nerf fémoral. Il est strictement sensitif et donne la sensibilité à la portion médiale de la face dorsale et plantaire des pattes arrières. Il est superficiel et donc facile d'accès chirurgicalement.



**Figure 9: Nerf sciatique et saphène chez le rat.**

(A) Racines nerveuses qui forment le nerf et embranchement du nerf. (B) Territoires cutanés innervés par chacun des nerfs (Decosterd et al., 2000).

### 3.1 Constriction chronique du sciatique (CCI)

#### *Description du modèle*

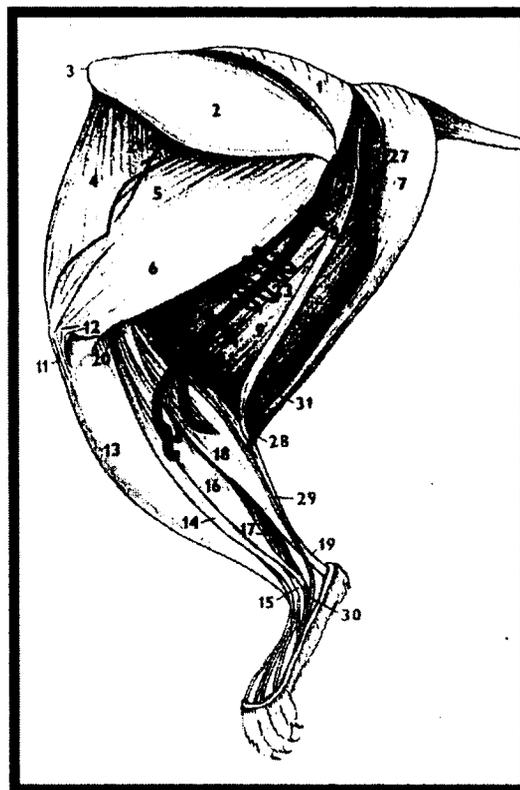
Ce modèle a vu le jour en 1988 (Bennett et al., 1988). Il consiste en l'application de 4 ligatures lâches à l'aide de fil chirurgical à environ 1 mm de distance chacune autour du nerf sciatique entre sa sortie du bassin et sa trifurcation (Figure 10). Les ligatures doivent être assez serrées pour retarder le flot sanguin du nerf sans toutefois l'interrompre. L'accès au nerf se fait par une incision cutanée d'environ 3 cm au centre de la cuisse postérieure du rat puis par une petite incision du muscle biceps fémoral complétée par une dissection par écartement du muscle. Dans le modèle initial, le côté controlatéral subissait une procédure **sham**. En chirurgie animale, une procédure, un rat ou une patte sham est un contrôle dans

lequel un rat subit toutes les étapes de la chirurgie à l'exception de l'étape qui caractérise le modèle. Dans le cas précis de la CCI, l'animal est anesthésié et subit toutes les étapes de la chirurgie à l'exception de la ligature du nerf. Ce type de contrôle sert à distinguer les effets directement reliés à la ligature des effets reliés aux autres étapes de la chirurgie (Wiley et al., 2003).

Les rats développent une boiterie variable durant la 1<sup>ère</sup> semaine mais elle se stabilise et s'améliore dans les semaines suivantes. Du côté ipsilatéral, la majorité des rats ont un léger pied tombant et leurs orteils sont ventrofléchies. Lorsqu'ils marchent, ils disposent leur patte affectée en éversion c'est-à-dire qu'ils touchent le plancher avec la partie médiale de celle-ci. Au repos, les rats soulèvent souvent la patte atteinte, la garde en position protégée près de leur flanc et transfèrent leur poids sur la hanche controlatérale. Ils peuvent parfois agiter la patte affectée ou la lécher de manière spontanée, voire même mordiller le bout de leurs griffes. Ces comportements nous laissent penser qu'ils ont de la douleur spontanée.

Les rats développent de l'hyperalgésie thermique du jour 2 jusqu'à au moins 2 mois post-opératoire, de l'allodynie au froid et aux stimuli mécaniques. Toutefois, l'hyperalgésie mécanique n'a pu être démontrée.

Le modèle de constriction chronique du sciatique a été comparé aux neuropathies suivantes chez l'humain : lésion nerveuse traumatique, neuropathie de compression et syndrome douloureux régional complexe type 2.



**Figure 10 : Constriction chronique du sciatique.**

Il consiste en l'application de 4 ligatures lâches à l'aide de fil chirurgical al à environ 1 mm de distance chacune autour du nerf sciatique entre sa sortie du bassin et sa trifurcation.

**3.2 Ligature partielle du nerf saphène (SPL)**

Rapporté en 2005, il est le dernier modèle ayant vu le jour (Walczak et al., 2005). Il a la particularité de faire une ligature partielle du nerf saphène. Il est facile à effectuer et pratiquement non traumatique. Les rats développent de l'allodynie mécanique et au froid et de l'hyperalgésie mécanique et thermique entre la 3<sup>e</sup> et la 5<sup>e</sup> journée post-opératoire. Comme il a été mentionné, le nerf saphène est un nerf strictement sensitif, ce qui a l'avantage d'éliminer les déficits moteurs notés dans les autres modèles. Cet avantage n'est pas négligeable puisque les déficits sont incommodants pour l'animal et pour l'expérimentateur lors des tests comportementaux. Toutefois, il y a encore peu d'article dans la littérature ayant utilisé ce modèle.

#### 4.0 TESTS COMPORTEMENTAUX DE DOULEUR

Ces tests permettent de quantifier de manière fiable l'allodynie et l'hyperalgésie. Il existe des tests équivalents utilisés en recherche clinique chez l'humain (section 2.3) (Mogil et al., 2004). Deux de ces tests, utilisés dans le cadre de ce projet de recherche, seront abordés dans cette section : le test de von Frey et le test plantaire. Dans le texte, *patte* réfère toujours à *patte arrière*.

##### 4.1 Test de von Frey

Le von Frey électronique automatique est le dernier appareil de cette catégorie sur le marché. Il s'agit d'un dispositif munit d'un filament métallique exerçant une force (convertie en g) qui augmente linéairement sous la patte (0 à 50 g), selon une vitesse présélectionnée (0 à 20 secondes), lorsque actionné par un bouton. Un miroir mobile permet de localiser l'endroit désiré d'application du stimulus (Figure 11). L'avantage de cet appareil est qu'il évite l'application manuelle du stimulus et que le filament n'est pas sujet aux changements secondaires à l'humidité. Le poids au retrait de la patte est déterminé par une moyenne de mesures (de 3 à 5), avec un intervalle de temps entre chaque stimulus (entre 10 et 30 s) selon les protocoles (Anderson et al., 2005; Villetti et al., 2003; Wiley et al., 2004).

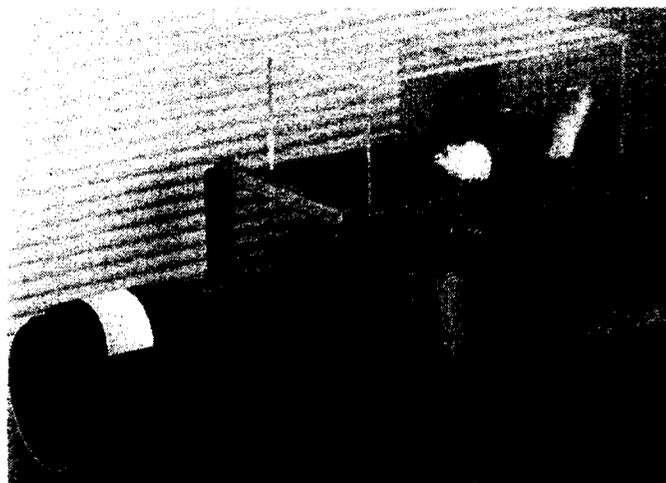
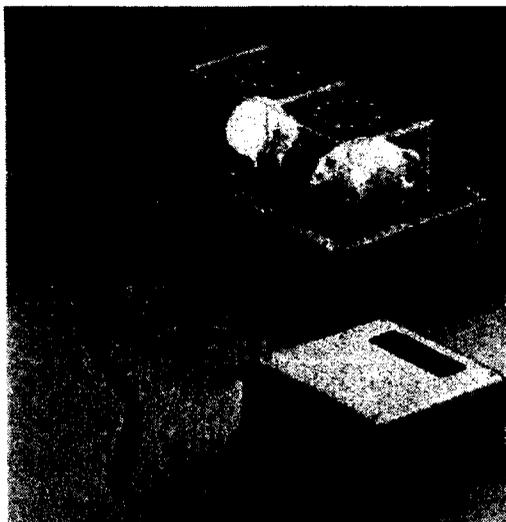


Figure 11: Von Frey électronique automatique.

## 4.2 Test plantaire ou méthode de Hargreaves

C'est un test de douleur aiguë qui mesure quantitativement l'hyperalgésie par l'application d'un stimulus thermique sur une zone précise de la patte arrière de l'animal et la mesure de la latence observée (en s) au retrait de la patte. (Hargreaves et al., 1988). Le retrait de la patte étant un réflexe spinal.

L'appareil est disponible via plusieurs compagnies. L'appareil de la compagnie Ugo-Basile fut utilisé pour ce projet (Figure 12). Il est constitué d'un dispositif cylindrique contenant en son centre une lampe halogène couplée à un filtre infrarouge qui bloque la lumière visible et laisse passer les rayons infrarouges. La lampe exerce une chaleur d'intensité constante à travers un obturateur lorsque actionnée. Elle est munie d'une fibre optique qui transmet à un capteur l'énergie réfléchie par la surface plantaire de l'animal. Dès que le capteur perçoit une variation de l'énergie réfléchie, il arrête la lampe et le contrôleur affiche alors le temps, au dixième de seconde près, au retrait de la patte. Le cylindre est mobile sur une plateforme qui possède 4 colonnes en ses coins supportant une vitre. Cette vitre conduit le stimulus thermique mais se refroidit rapidement à température pièce. Sur la vitre, un support de plastique formant des cages séparées est placé. Les rats sont installés dans ces cages. La source de chaleur est à 2 mm de la vitre. L'intensité de la chaleur est réglable préalablement entre 10 et 99 V. Dans la littérature, l'intensité est le plus souvent ajustée à 50 V. À cette intensité, l'humain testant son propre pouce sur la source de chaleur ressentira la douleur après 10-12 s. La chaleur exercée à un niveau d'intensité donné est constante. Des stimuli successifs (3 à 5) sont appliqués aux 2 pattes en alternance à intervalles de 3 à 5 minutes. Les intervalles sont nécessaires pour éviter la sensibilisation périphérique mais, il a été démontré que le derme et l'épiderme même lorsque chauffés à des températures bien au-delà de celles atteintes avec une intensité à 50 V retournent à des températures basales de manière exponentielles en un maximum de 90 s (Wiley et al., 2004; Yeomans et al., 1994). Hargreaves et al. ont démontré que ce test ne produit pas d'habituation chez les rongeurs même lorsque répété plusieurs fois sur une période d'une journée (Hargreaves et al., 1988).



**Figure 12 : Test plantaire ou méthode de Hargreaves.**

Ce test est controversé dans la littérature. Les principales questions sont les suivantes : Est-ce que la latence observée au retrait de la patte correspond vraiment au seuil d'activation des nocicepteurs? Est-ce qu'une diminution de la latence est synonyme d'hyperalgésie? Lors d'études pharmacologiques, est-ce qu'une augmentation de la latence est synonyme d'analgésie? Les arguments qui suivront nous amèneront à répondre par l'affirmative à toutes ces questions. Premièrement, l'application d'un stimulus thermique d'intensité constante à la surface des pattes du rat fait varier linéairement la température au niveau du derme et de l'épiderme profond, justement à l'endroit où se situent les terminaisons des nocicepteurs (Yeomans et al., 1994). Deuxièmement, les nocicepteurs (Campbell et al., 1979; LaMotte et al., 1983; Torebjork et al., 1984) et les neurones du tractus spinothalamique (Gebhart et al., 1983; Menetrey et al., 1979; Zimmermann, 1977) sont activés de manière linéaire par l'augmentation linéaire de la température. Troisièmement, l'intensité de la douleur perçue chez l'humain varie linéairement avec la température de la peau et donc avec l'activation des nocicepteurs (Campbell et al., 1991; Handwerker et al., 1993; Simone et al., 1991). Quatrièmement, suite au stimulus thermique sur la surface plantaire, les rats retirent leur patte à une température de 45.2°C. Ce seuil correspond au seuil de douleur observé chez l'humain, le singe et le cobaye (Hargreaves et al., 1988).

En résumé, le test plantaire produit un stimulus d'intensité constante à la surface plantaire. Cela produit une augmentation linéaire de la température à l'endroit où sont situés les nocicepteurs. L'augmentation linéaire de la température active linéairement les

nocicepteurs et l'intensité de la douleur. Le test plantaire et la latence mesurée au retrait de la patte mesure donc réellement le seuil d'activation des nocicepteurs. Ainsi, une diminution de la latence est synonyme d'une diminution du seuil d'activation des nocicepteurs ce qui correspond à la définition de l'hyperalgésie et une augmentation de la latence est égale à une augmentation du seuil d'activation des nocicepteurs, donc à de l'analgésie (Yeomans et al., 1994).

## **5.0 INJECTION INTRATHÉCALE (IT) CHEZ LE RAT**

L'injection IT est largement utilisée en recherche fondamentale pour tester de nouveaux composés. La moelle épinière est un important site d'action pour les drogues, particulièrement en ce qui concerne la nociception. Lors de son injection IT, le site d'action d'une drogue est principalement sinon totalement, restreint à la moelle (Hammond, 1988). Ce dernier point sera abordé en détail, mais avant voici une description de la technique :

Le rat est sous anesthésie légère, en décubitus ventral, le bas du corps surélevé pour permettre une ouverture des espaces entre les vertèbres (Figure 13). Le processus épineux L4 est proéminent et sert de repère anatomique. L'injection se fait à l'aide d'une aiguille de petit calibre, dans l'espace L4-L5 ou plus rarement L5-L6. À ce niveau, la moelle est terminée et laisse place aux racines nerveuses lombosacrées. Ainsi, lorsque l'aiguille est au bon endroit, la queue du rat tressaille.

Les études utilisant l'injection IT se basent sur la prémisse que la substance injectée agit seulement au niveau médullaire. Différents arguments nous permettent de penser cela. Tout d'abord, l'injection IT chez le rat de 10  $\mu$ l de bleu d'Evans à la jonction thoracolombaire ne parcourt pas plus que 2.5 à 3.5 cm en amont et en aval (Hammond, 1988). Toutefois, le chemin parcouru par le colorant est dépendant du volume injecté. Pour cette raison, le volume d'injection ne doit pas dépasser 10% du volume total du liquide céphalo-rachidien (LCR) soit 25  $\mu$ l chez le rat adulte (Bass et al., 1973; Burns et al., 1976; Rieselbach et al., 1962). Cependant, l'évaluation de la densité de la coloration du tissu est une mesure qualitative et cet argument n'est extrapolable que si la substance pharmacologique injectée possède des propriétés physicochimiques semblables au colorant.

Un argument de plus fort poids provient des études de substances radiomarquées chez le rat. Ces études permettent une quantification de la substance à différents sites. Il en ressort que les substances lipophiles restent aux segments injectés mais qu'après ~15 minutes elles se redistribuent dans d'autres compartiments, via la circulation périphérique, dont le cerveau, mais en très faibles quantités. Les substances hydrophiles demeurent quant à elles presque totalement dans l'espace IT mais un très faible pourcentage de la dose administrée voyage en supraspinal transportée par le flot du LCR. Le flot du LCR chez le rat semble s'effectuer en ~60 minutes. Donc, les substances hydrophiles et lipophiles finissent par se retrouver en supraspinal mais par des mécanismes différents et toujours en de très faibles quantités (Hammond, 1988).



**Figure 13 : Injection intrathécale chez le rat.**

## **6.0 ANESTHÉSIE CHEZ LE RAT**

Les anesthésiques volatils halogénés, particulièrement l'isoflurane, sont les plus couramment employés (Kona-Boun et al., 2004). L'isoflurane est éliminé presque entièrement par les poumons. Il est caractérisé par un temps d'induction et de récupération rapide et ce, même après une anesthésie prolongée (Diven, 2003).

## 7.0 NEUROTENSINE (NT)

La neurotensine est un peptide neuromodulateur au niveau du système nerveux et une hormone aux actions paracrine et endocrine dans le système digestif et cardiovasculaire (Tyler-McMahon et al., 2000). Nous parlerons seulement des effets centraux de la NT. Particulièrement, de sa propriété d'induire une analgésie opiacé-indépendante (Kitabgi, 2002).

### 7.1 Découverte

La NT fut découverte de manière fortuite en 1973 lors de l'isolation et de la purification de la substance P à partir d'hypothalamus bovins (Carraway et al., 1973). Elle fut nommée neurotensine puisqu'elle a été trouvée dans le cerveau et qu'elle entraîne de l'hypotension (Kitabgi et al., 1992).

### 7.2 Structure

La NT est composée de 13 acides aminés (aa) (Figure 14), son extrémité amino-terminale est bloquée mais son extrémité carboxy-terminale est libre, son poids moléculaire est de 1674 Daltons (Carraway et al., 1975). Sa partie carboxy-terminale (8-13) possède l'essentiel des propriétés pharmacologiques du peptide entier et se retrouve très conservée chez toutes les espèces où le peptide a été étudié.



Figure 14 : Séquence de la neurotensine.

### 7.3 Synthèse

La NT est synthétisée à partir d'un précurseur : la pro-neurotensine. Elle est une protéine de 170 aa chez le chien et de 120 aa chez l'homme (Bean et al., 1992; Dobner et al., 1987). Sa séquence est hautement conservée d'une espèce à l'autre. Chez l'homme, le gène codant pour le précurseur est porté par le chromosome 12 (Marondel et al., 1996). La pro-NT a la

capacité de générer différents peptides. Dans le cerveau, le contrôle post-transcriptionnel du précurseur donne la NT et la neuromédine N (NN), un hexapeptide cloné en 1984 (Vincent et al., 1999). La NN active les récepteurs de la NT et exerce les mêmes effets que cette dernière. Jusqu'à maintenant les études pour identifier le récepteur de la NN ont échoué. Les différences entre la NT et la NN sont dues au contrôle post-transcriptionnel spécifique au tissu et à la dégradation plus rapide de la NN par des peptidases différentes de la NT (Kitabgi et al., 1992).

#### **7.4 Dégradation**

Protégée des activités aminopeptidasiques par le groupement *pyroGlu*, la NT n'est soumise qu'à l'attaque d'endopeptidases et de carboxypeptidases spécifiques aux tissus (Zsürger, 2001). Lorsque sécrétée en périphérie, la NT possède une demi-vie courte d'environ 15 minutes et elle ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique. Pour cette raison, elle doit être injectée directement dans le SNC lors de l'étude de ses effets dans les modèles animaux (Tyler-McMahon et al., 2000).

#### **7.5 Localisation de la NT dans le système nerveux**

Dans le SNC, la NT est localisée dans les neurones, soit dans le corps cellulaire, soit dans les terminaisons nerveuses. À la différence des neurotransmetteurs, les peptides neuromodulateurs peuvent diffuser plus ou moins loin et stimuler des populations neuronales diverses (Zsürger, 2001).

La NT est distribuée de manière semblable chez le rat et l'homme (Carraway et al., 1976; Cooper et al., 1981). La NT est présente dans les zones impliquées dans le contrôle de la douleur : dans la SGPA, le noyau raphé magnus ainsi que dans la couche II de la corne dorsale de la moelle (Dobner, 2005), elle est aussi présente en faible quantité dans le corps cellulaire du neurone de 1<sup>er</sup> ordre (Zhang et al., 1996). « La neurotensine est également localisée dans des aires impliquées dans la thermorégulation, [...] (Zsüger, 2001) ».

## 8.0 RÉCEPTEURS DE LA NT (NTR)

Le cerveau des souris, des rats, et des humains contiennent 2 sites de liaison différents pour la NT : NTR1, site de liaison de haute affinité ( $K_d = 0.1-0.3$  nM) inhibé par le  $\text{Na}^+$  et le GTP et NTR2, site de liaison de basse affinité ( $K_d = 3-5$  nM) peu sensible au  $\text{Na}^+$ , insensible au GTP mais antagonisé par l'antihistaminique H1 lévocabastine (Vincent et al., 1999). Ces 2 récepteurs ont été clonés. L'existence d'un 3<sup>e</sup> récepteur est apparue plus tardivement au cours d'expériences de purification de l'activité de liaison de la NT (Zsüger, 2001). Ces 3 récepteurs reconnaissent le fragment C-terminal 8-13 de la NT (Tyler-McMahon et al., 2000).

### 8.1 Récepteur à haute affinité: NTR1

En 1990, le récepteur NTR1 du rat a été cloné par l'équipe de Tanaka et al. (Tanaka et al., 1990) (Figure 15). Le récepteur humain a ensuite été cloné en 1993 (Vita et al., 1993). Chez l'homme, le gène a été localisé sur le bras long du chromosome 13. NTR1 est une protéine d'environ 47 kDa ayant 424 aa chez le rat et 418 aa chez l'humain. Ces 2 protéines possèdent 84% d'homologie. NTR1 est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines Gq activant la phospholipase C (Kitabgi, 2002). L'affinité de ce récepteur pour la NT est d'environ 0.1 nM. La liaison de la NT au récepteur induit la stimulation de la phospholipase C qui a pour conséquence la production d'inositol triphosphate ( $\text{IP}_3$ ) et de diacylglycérol à partir de phospholipides membranaires (Bean et al., 1992).  $\text{IP}_3$  provoque alors la mobilisation de calcium intracellulaire. Dépendamment de la lignée cellulaire étudiée, l'élévation du calcium intracellulaire se traduit par une 2<sup>e</sup> séquence d'événements pouvant inclure notamment l'activation de la guanylate cyclase, de l'adénylate cyclase ou la production d'acide arachidonique. Donc, la NT induit l'activation simultanée de plusieurs voies de transduction qui sont susceptibles de rétroagir les unes sur les autres (Zsüger, 2001). Suite à l'interaction avec la NT, il y a internalisation de 60 à 70% du récepteur (Chabry et al., 1995). Les évidences biochimiques suggèrent que le récepteur n'est pas recyclé à la membrane après son internalisation (Botto et al., 1998).

Dans le SNC, NTR1 est localisé exclusivement dans les neurones. Les récepteurs membranaires sont répartis de façon diffuse sur l'axone. Chez toutes les espèces étudiée

soit le rat, le pigeon, le cobaye, le singe et l'humain, NTR1 est présent essentiellement dans les neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta et de l'aire tegmentaire ventrale (mésencéphale ventral), dans la SGPA (mésencéphale dorsal) et dans les neurones sérotonergiques à projection spinale du noyau raphé magnus (bulbe rostroventral) (Buhler et al., 2005). Dans la moelle épinière, les concentrations les plus élevées sont retrouvées dans les couches I et II de la corne dorsale (Jennes et al., 1982).

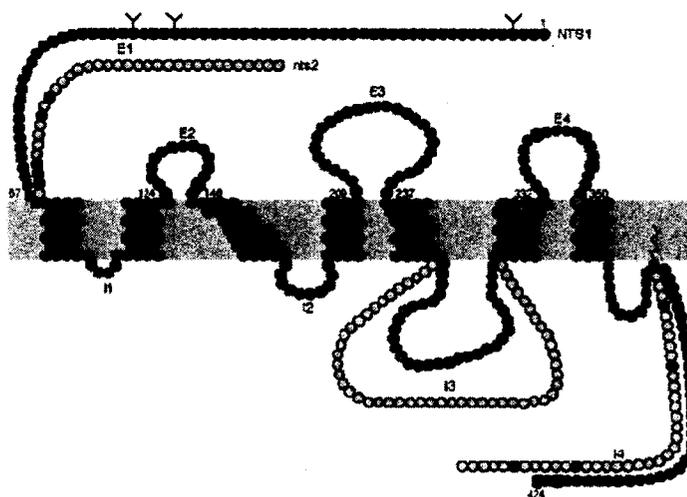
## **8.2 Récepteur à faible affinité : NTR2**

Le récepteur à faible affinité a été cloné chez la souris, le rat et l'humain (Chalon et al., 1996; Mazella et al., 1996; Vita et al., 1998). NTR2 est une protéine de 416 aa chez la souris et le rat (Figure 15) et de 410 aa chez l'humain (Vincent et al., 1999). La masse moléculaire de la protéine est de 45 kDa (Botto et al., 1998). NTR1 et NTR2 ont 64% d'homologie. NTR2, lui-aussi un récepteur à 7 domaines transmembranaire, possède une queue extracellulaire N-terminale et une 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire plus courte que NTR1 (Figure 22). Les NTR2 natifs caractérisés dans les cerveaux de souris, de rat et d'humain présentent des propriétés de liaisons similaires pour la NT, avec une affinité de 3 à 5 nM. Cette liaison est antagonisée par la lévocabastine, antihistaminique H1. L'expression du NTR2 cloné a permis de mettre en évidence un certain nombre de réponses intracellulaires suite à l'activation de ce récepteur mais jusqu'à ce jour, aucune protéine G n'a été identifiée comme étant couplée à NTR2 (Zsüger, 2001).

Contrairement au NTR1, NTR2 a une double localisation neuronale et gliale. Ce récepteur a une distribution régionale beaucoup plus diffuse que NTR1 (Zsüger, 2001). Les concentrations les plus importantes sont retrouvées dans le néocortex (aire préfrontale, cortex pariétal et occipital), dans l'hippocampe, dans le ganglion géniculé latéral, dans les noyaux rouges et la région prétectale du mésencéphale (Zsüger, 2001). NTR2 a aussi été localisé dans la SGPA et dans le noyau raphé magnus (Sarret et al., 2003). Des expériences d'immunofluorescence chez le rat ont démontré une immunoréactivité intense pour NTR2 dans les couches I et II de la moelle épinière ainsi que dans les corps cellulaires des neurones de 1<sup>er</sup> ordre (Sarret et al., 2005).

### 8.3 NTR3

En 1998, un 3<sup>e</sup> site de la liaison de la NT a été cloné et caractérisé. Ce site de liaison possède 100% d'homologie avec la protéine gp95/sortilin préalablement identifiée. Ce récepteur est totalement différent des 2 précédents. Il s'agit d'une protéine de 833 aa, d'une masse moléculaire d'environ 100 kDa, présentant un seul domaine transmembranaire, une courte extrémité cytoplasmique et une longue portion extracellulaire. Jusqu'à maintenant, le rôle physiologique de ce récepteur est encore mal connu et aucun mécanisme de transduction n'a été identifié (Tyler-McMahon et al., 2000).



**Figure 15 : Récepteurs de la neurotensine : 2 récepteurs à 7 domaines transmembranaires.**

NTR2 possède une queue extracellulaire N-terminale plus courte et une 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire plus longue que NTR1.

### 9.0 EFFETS DE LA NT

Il est apparu rapidement que les injections intracérébrales (IC), intrathécales (IT) et intraveineuse (iv) n'amenaient pas les mêmes effets et effectivement, la NT ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique (Schaeffer et al., 1998). Pour cette raison, la NT doit être injectée directement dans le SNC pour l'étude de ses effets centraux. Pour mettre en évidence un effet, les expériences doivent être menées avec des doses supra-physiologiques du peptide et les résultats ainsi obtenus peuvent être difficile à interpréter puisqu'à très forte concentration la NT perd sa sélectivité pour ses seuls récepteurs et peut se lier à d'autres

types de récepteurs. Cela peut expliquer qu'à partir d'une dose seuil les effets de la NT peuvent plafonner et même se renverser (Zsüger, 2001). Seulement, les effets centraux du peptide seront abordés. Toutefois, la vasodilatation induite par la NT en périphérie sera discutée puisque cet effet fut observé lors de nos expériences avec des analogues de la NT.

### **9.1 Effet périphérique de la NT**

**Vasodilatation :** La NT a d'abord été reconnue pour ses effets périphériques vasodilatateurs. L'injection iv de NT (>200 pmol/kg) produit rapidement (~30 secondes) une vasodilatation des petits vaisseaux visibles au niveau des oreilles, du pourtour de la bouche et des pattes du rat. Cette vasodilatation s'accompagne d'une augmentation de la perméabilité vasculaire et d'une hypotension (Carraway et al., 1973). Elle est secondaire à la stimulation par la NT du récepteur NTR1 situé sur les mastocytes (Schaeffer et al., 1998). Les mastocytes stimulés relâchent de l'histamine et de la sérotonine, tous 2 reconnus pour entraîner un effet direct de relaxation sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux périphériques.

### **9.2 Effets centraux de la NT**

**Diminution de l'activité locomotrice spontanée :** Chez le rat et la souris, il y a une diminution de l'activité locomotrice spontanée suite à l'injection intracérébroventriculaire (ICV) (Clineschmidt et al., 1979; Elliott et al., 1986) ou IT (Osbaahr et al., 1981) de NT. Cet effet n'est pas observé lors de l'injection iv et est dépendant de la dose. Cependant, les souris soumises au test du rotarod (test pour la coordination motrice des rongeurs) maintiennent des performances tout à fait normales même sous l'effet de très fortes doses de NT (2.5 µg par souris, soit l'équivalent ~114 µg/kg). Donc, malgré une diminution de l'activité locomotrice spontanée, les souris préservent une coordination motrice et un équilibre normal et demeurent tout à fait aptes à répondre à un stimulus (Clineschmidt et al., 1979).

**Hypothermie :** La NT en injection ICV ou IT provoque une hypothermie chez le rat et la souris (Clineschmidt et al., 1979; Martin et al., 1982; Nemeroff et al., 1977). Cette

hypothermie est dose-dépendante et lors de l'injection ICV chez la souris, survient à partir de très faibles doses de NT. En ICV, elle est présente au moins à partir de la 30<sup>e</sup> minute jusqu'à 240 minutes après l'injection (Clineschmidt et al., 1979). Toutefois, rien n'est mentionné quant à ce qui se passe avant la 30<sup>e</sup> minute. De plus, aucune littérature concernant l'évolution temporelle de l'hypothermie lors d'injection IT n'a été retrouvée. Le mécanisme d'action par lequel elle survient n'est également pas expliqué. En ICV, elle est le plus vraisemblablement secondaire à l'accès de la NT à l'hypothalamus via les organes circumventriculaires. L'hypothalamus est un important centre de thermorégulation. En ce qui concerne l'hypothermie induite par injection IT, il est plus ardu de faire des hypothèses. La NT est une molécule à tendance hydrophile; elle reste en presque totalité dans l'espace IT. Un faible pourcentage de la dose administrée voyage en supraspinal transporté pas le flot du LCR et donc, peut avoir accès à l'hypothalamus via les organes circumventriculaires. Toutefois, le circuit du LCR chez le rat est estimé à ~60 minutes. De plus, la NT n'est pas redistribuée dans les autres compartiments tel que le compartiment vasculaire; l'hypothermie n'est donc pas induite par les effets de la NT en périphérie. Toutefois, cette hypothèse est plausible dans le cas d'un analogue lipophile de la NT.

## **Analgésie**

### ***Analgésie spinale et supraspinale en douleur aiguë et tonique***

En 1977, un 1<sup>er</sup> article rapportait l'effet analgésique dose-dépendant, opiacé-indépendant de la NT injectée en ICV chez la souris dans le test de la plaque chaude et dans le test de l'acide acétique pour les crampes abdominales (Clineschmidt et al., 1977). Par la suite, de nombreuses études ont confirmé cet effet tant au niveau spinal que supraspinal. Au niveau spinal, la NT en IT augmente le seuil de douleur dans le test de la plaque chaude, le test de la chaleur pour le retrait de la queue, le test de l'acide acétique pour les crampes abdominales et plus récemment, dans un modèle de douleur tonique induite par la formaline (Clineschmidt et al., 1982; Martin et al., 1982; Roussy et al., 2008; Spampinato et al., 1988; Yaksh et al., 1982). En supraspinal, l'injection de NT dans la SGPA, dans le bulbe rostroventral et dans d'autres régions du cerveau qui envoient des afférences à ces 2 dernières entraîne une réponse antinociceptive dans les modèles de douleur aiguë (Benmoussa et al., 1996; Kalivas et al., 1982; Urban et al., 1993). Par contre, lorsque les

doses injectées sont physiologiques (0.03 pmol à 0.03 nmol), l'effet observé est une hyperalgésie (Smith et al., 1997; Urban et al., 1993).

Il a été mentionné dans le paragraphe précédent que la NT entraîne une hypothermie. Toutefois, cette dernière n'est pas responsable de l'effet analgésique de la NT lors de tests de douleur aiguë utilisant des stimuli thermiques. En effet, l'hypothermie induite par d'autres drogues (chlorpromazine, 5-hydroxytryptophan ou oxotremorine) n'entraîne pas de changement au test de la plaque chaude (Clineschmidt et al., 1979).

### ***Implication de NTR1 et NTR2 dans l'effet analgésique***

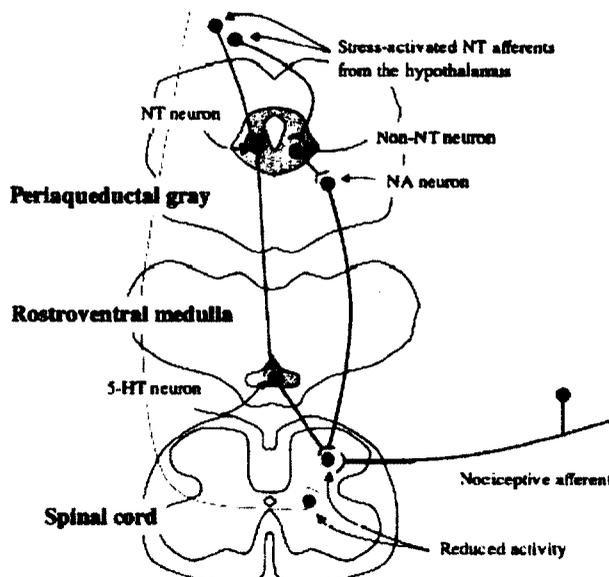
À ce jour, les efforts menés pour déterminer via lequel de ses récepteurs la NT entraîne une analgésie ont donné des résultats contradictoires. D'un côté, la réduction partielle de NTR1 par la technologie anti-sens (Tyler et al., 1998; Tyler et al., 1999) et les souris invalidées pour le gène codant pour le récepteur NTR1 (Pettibone et al., 2002) ont démontré une réduction significative de l'effet analgésique de la NT. De plus, l'analgésie induite par la NT injectée dans le bulbe rostroventral est réduite par l'administration de l'antagoniste spécifique NTR1, SR48692 (Smith et al., 1997). Néanmoins, les 1<sup>ères</sup> indications de l'implication d'un autre récepteur, outre NTR1, furent que l'effet analgésique des différents analogues de la NT ne corrélait pas avec leur affinité pour NTR1 (Labbe-Jullie et al., 1994; Tyler et al., 1998) tandis qu'il correspondait avec leur affinité pour NTR2 (Dubuc et al., 1999). La réduction partielle de NTR2 par la technologie anti-sens atténue, elle aussi, l'effet antinociceptif de la NT (Dubuc et al., 1999). De même, des études avec les antagonistes des récepteurs de la NT ont démontré l'implication de NTR2; l'administration de SR142948A, un antagoniste non spécifique des récepteurs de la NT, réduit l'effet analgésique de la NT (Gully et al., 1997) tandis que l'antagoniste NTR1, SR48692, n'affecte pas la réponse analgésique à la NT (Dubuc et al., 1994). Ces résultats divergents laissent suggérer que les 2 récepteurs sont impliqués dans l'effet analgésique de la NT.

### *Mécanismes de la modulation de la douleur par la NT*

La NT et ses récepteurs sont présents dans les zones reconnues pour le contrôle de la douleur. Le stress aigu induit un contrôle descendant antinociceptif via un relais entre la SGPA, le bulbe rostroventral et la moelle postérieure (section 1). Des rats soumis au stress de nage dans l'eau froide, prétraités avec de la naloxone, présentent une réponse antinociceptive suivie d'une augmentation rapide de l'ARN messager de la NT au niveau de la région préoptique et latérale de l'hypothalamus, deux régions qui envoient des projections neurotensinergiques à la SGPA (Mokha et al., 1987; Rizvi et al., 1996; Seta et al., 2001). Deux classes de neurones modulateurs de la douleur aux effets opposés ont été identifiées dans la SGPA et dans le bulbe rostroventral ; ils sont désignés cellules "on" et cellules "off" (Fields et al., 1983; Heinricher et al., 1987). Dans le test de la chaleur pour le retrait de la queue, les cellules "on" sont activées et les cellules "off" sont inhibées. Dans ce même test, suite à l'injection dans le bulbe rostroventral de doses physiologiques de NT, il y a activation des cellules "on" et développement d'hyperalgésie tandis qu'à fortes doses de NT, les 2 types de cellules sont activées et il y a analgésie (Neubert et al., 2004). Les neurones du bulbe rostroventral exprimant NTR1 contiennent de la sérotonine. L'activation de NTR1 par la NT ou l'agoniste NTR1, PD149163, entraîne une réponse analgésique dans le test de la chaleur pour le retrait de la queue qui est inhibée par l'administration de l'antagoniste NTR1 SR48692 ou de l'antagoniste sérotonergique méthysergide (Buhler et al., 2005).

**En résumé**, l'hypothèse avancée est que les stress intenses stimulent l'hypothalamus. Celui-ci envoie des projections neurotensinergiques à la SGPA, grâce auxquelles il y aurait recrutement de cellules "off" neurotensinergiques qui à leur tour enverraient des afférences dans le bulbe rostroventral. Dans le bulbe, des neurones NTR1 sérotonergiques à projection spinale seraient activés et complèteraient le contrôle inhibiteur descendant en activant des interneurons inhibiteurs dans la corne postérieure (Figure 16). Les mêmes mécanismes se produiraient lors de l'injection de NT dans la SGPA ou dans le bulbe rostroventral. Par contre, en absence de stress, la NT faciliterait la douleur en activant les cellules "on" et

seraient l'équivalent des effets observés lors de l'injection de doses physiologiques de NT (Dobner, 2005, 2006).



**Figure 16 : Hypothèse du mécanisme de modulation de la douleur par le système neurotensinergique.**

Tirée de Dobner, 2005.

## 10.0 ANALOGUES NEUROTENSINERGIQUES

La NT n'a pas l'habileté de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE). Elle est rapidement dégradée par diverses peptidases et sa partie carboxy-terminale (8-13) possède l'essentiel des propriétés pharmacologiques du peptide entier. Pour ces raisons, beaucoup de travail a été accompli durant les 15 dernières années pour le développement d'analogues plus stables ayant la propriété de traverser la BHE (Boules et al., 2006).

**NT69L (N-Me-Arg-lys-Pro-neo-trp-Tle-Leu)** est un analogue peptidique du segment (8-13) de la NT. Il a la capacité de traverser la BHE. Il possède une demi-vie plus longue que la NT et induit une analgésie rapide (à l'intérieur de 15 minutes) et de longue durée (plus de 5 h) chez le rat (Tyler-McMahon et al., 2000). Il a une affinité élevée pour les récepteurs NTR1 ( $K_d$  (nM); rat [ $8.2 \times 10^{-1}$ ], humain [1.55]) et NTR2 (humain [2.1]). Les autres effets centraux et périphériques sont semblables à ceux de la NT (Boules et al., 2006).

**PD149163 (H-Lys-psi[CH<sub>2</sub>NH]-Lys-Pro-Trp-Tle-Leu-Oet)** est un analogue peptidique du segment (8-13) de la NT et a la capacité de traverser la BHE (Wustrow et al., 1995). Il est métaboliquement stable et il est le premier agoniste sélectif pour NTR1. En effet, il a une affinité significative pour NTR1 ( $K_d = 31-159$  nM) mais il n'a pas d'affinité pour NTR2 ( $K_d > 10\ 000$  nM). PD149163 a été peu étudié à ce jour. Deux études ont rapporté ses effets s'apparentant aux antipsychotiques (Feifel et al., 2003; Feifel et al., 1999). Une étude a mis en évidence l'effet analgésique du peptide en douleur aiguë (Buhler et al., 2005) et plus récemment, une étude a démontré une analgésie en douleur tonique (Roussy et al., 2008).

## **11.0 AGONISTES NEUROTENSINERGIQUES ET DOULEUR NEUROPATHIQUE**

Il existe beaucoup de littérature corroborant l'effet analgésique des agonistes neurotensinergiques en douleur aiguë. Récemment, son effet analgésique en douleur tonique a été démontré (Roussy et al., 2008) Toutefois, il existe peu de donnée concernant la douleur neuropathique. Dans 3 modèles animaux de douleur chronique, Williams et al. ont démontré une augmentation de l'ARNm de la NT dans diverses structures du tronc cérébral impliquées dans la modulation de la douleur (SGPA, noyaux du raphé dorsal, noyaux microcellulaire, pédonculopontin et latéraux du tegmentum, noyau mésencéphalique profond) (Williams et al., 1993).

Dans un modèle de CCI avec prothèse de polyéthylène, la NT a été détectée par spectrométrie de masse, seulement dans la moelle des rats qui avaient développé de la douleur neuropathique (Vachon et al., 2004).

Dans une étude sur les changements géniques survenant dans les ganglions rachidiens de rats ayant subi des axotomies bilatérales du nerf sciatique, il a été démontré qu'au jour 2 post-chirurgie il y a une augmentation par un facteur 2 du gène codant pour le NTR2. Par contre, aux jours 7, 14 et 28, c'est une diminution qui est observée (Xiao et al., 2002).

Zhang et al. ont eu des résultats contradictoires dans des publications subséquentes. En 1995, ils ont démontré, aux jours 2, 7, 14, 21 et 28 post-chirurgie, une diminution marquée de l'ARNm du NTR dans les ganglions rachidiens ainsi qu'une diminution de la NT dans les neurones des couches superficielles de la corne postérieure ipsilatéralement à une axotomie du nerf sciatique (Zhang et al., 1995). L'année suivante, avec le même genre de protocole, au jour 2 post-chirurgie, ils ont tout d'abord démontré une augmentation de la NT et de son ARNm dans les ganglions rachidiens ipsilatéraux mais revenant à un niveau normal après 2 semaines (Zhang et al., 1996).

## OBJECTIFS DU PROJET

La douleur neuropathique est une douleur chronique initiée ou causée par une lésion primaire du système nerveux qui handicape la vie des gens qui en sont atteints. Malheureusement, il existe un nombre limité de médicaments efficaces pour cette affliction. La neurotensine dont le potentiel analgésique a été maintes fois démontré en douleur aiguë et plus récemment, en douleur tonique représente une alternative à considérer pour soulager la douleur neuropathique. Jusqu'à maintenant, son effet n'a jamais été étudié en douleur neuropathique, de même pour le rôle respectif des récepteurs NTR1 et NTR2 de la neurotensine en douleur neuropathique. Le modèle de constriction chronique chez le rat est un modèle chirurgical validé pour tester de nouveaux traitements pharmacologiques en douleur neuropathique.

Les objectifs de ce projet sont donc de :

1. Maîtriser le modèle chirurgical de constriction chronique du sciatique.
2. Démontrer le développement de douleur neuropathique, soit d'allodynie mécanique et d'hyperalgésie thermique chez les rats via les tests de Von Frey électronique automatique et le test plantaire.
3. Déterminer si la neurotensine, l'agoniste spécifique de NTR1, PD149163, et l'agoniste NTR1/NTR2, NT69L, ont un effet analgésique en douleur neuropathique.

**Avant-propos de l'article****INTRATHECAL ADMINISTRATION OF NTS1 AGONISTS REVERSE  
NOCICEPTIVE BEHAVIOR IN A RAT MODEL OF NEUROPATHIC PAIN**

**Annie Guillemette<sup>1</sup>, Marc-André Dansereau<sup>1</sup>, Nicolas Beaudet<sup>1</sup>, Elliot Richelson<sup>2</sup>, and  
Philippe Sarret<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Department of Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine and Health Sciences,  
Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada.

<sup>2</sup> Department of Psychiatry and Psychology, Mayo Clinic College of Medicine,  
Jacksonville, FL 32224, USA.

**Statut de l'article : accepté en 2011 dans l'*European Journal of Pain***

**Contributions :**

J'ai effectué toutes les expérimentations, analyse des résultats, les analyses de laboratoire ainsi que l'écriture de l'article à proprement dit sous la supervision de mon directeur de recherche.

### Résumé de l'article en français

La douleur neuropathique, qui peut être secondaire à un dommage nerveux périphérique, constitue un problème médical important. Les traitements pharmacologiques actuels arrivent adéquatément à soulager ce type de douleur que la moitié du temps. Nous, de même que d'autres laboratoires, avons démontré que les deux sous-types de récepteurs de la neurotensine (NT), NTR1 et NTR2, sont impliqués dans la réponse analgésique opiacé-indépendante de la neurotensine dans différents tests de douleur aiguë tels que le test de la plaque chaude et le test de la chaleur pour le retrait de la queue, ainsi que dans un test de douleur tonique. Cependant, le rôle respectif de chacun de ces récepteurs en douleur neuropathique a été peu investigué. Dans cette étude, nous avons examiné si les injections intrathécales de NT et d'agonistes NTR1 et NTR1/NTR2 étaient efficaces pour réduire les symptômes de douleur neuropathique chez les rats. La douleur neuropathique était induite par une chirurgie de constriction du nerf sciatique (modèle de constriction chronique du sciatique). Le développement d'allodynie mécanique et d'hyperalgésie thermique fut examiné sur les pattes arrière ipsi et contralatérales aux jours 3, 7, 14, 21 et 28 post-opératoire. Les rats ayant subi la constriction chronique du sciatique (CCI) ont démontré une augmentation significative du seuil d'allodynie mécanique et d'hyperalgésie thermique sur une période de 28 jours. L'injection spinale de NT aux rats CCI a diminué leur réponse à la douleur induite par un stimulus mécanique et par stimulus thermique. Nous avons noté un soulagement de l'allodynie à 91% avec la NT 6 µg/kg. L'injection intrathécale de l'agoniste sélectif NTR1 PD149163 (30 et 90 µg/kg), de même que l'agoniste NTR1/NTR2 NT69L (5 et 25 µg/kg, ont aussi produit une réponse anti-allodynique et anti-hyperalgésique importante. En conclusion, nos résultats démontrent que la NT entraîne une analgésie importante en douleur neuropathique. Nos résultats supportent l'implication du récepteur NTR1 dans cette réponse analgésique, de même que l'utilisation d'agonistes NTR1 pour le traitement de douleur neuropathique.

## ABSTRACT

Chronic neuropathic pain arising from peripheral nerve damage is a severe clinical issue where there is a major unmet medical need. We previously demonstrated that both neurotensin (NT) receptor subtypes 1 (NTS1) and 2 (NTS2) are involved in mediating the naloxone-insensitive antinociceptive effects of neurotensin in different analgesic tests including hotplate, tail-flick, and tonic pain. However, the role of these receptors in neuropathic pain management has been poorly investigated. In the present study, we therefore examined whether intrathecal delivery of NTS1 agonists was effective in reducing neuropathic pain symptoms in rats. Neuropathy was induced by sciatic nerve constriction (CCI model), and the development of mechanical allodynia and thermal hyperalgesia on the ipsi- and contralateral hind paws was examined 3, 7, 14, 21, and 28 days post-surgery. CCI-operated rats exhibited significant increases in thermal and mechanical hypersensitivities over a 28-day testing period. Spinal injection of NT to CCI rats alleviated the behavioral responses to radiant heat and mechanical stimuli, with a maximal reversal of 91% of allodynia at 6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Intrathecal administration of the NTS1-selective agonist, PD149163 (30-90  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) also produced potent anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects in nerve-injured rats. Likewise, heat hyperalgesia and tactile allodynia produced by CCI of the sciatic nerve were fully reversed by the NTS1 agonist, NT69L (5-25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Altogether, these results support the idea that the NTS1 receptor subtype is involved in pain modulation, and the potential use of NTS1 agonists for the treatment of painful neuropathies.

## INTRODUCTION

Chronic neuropathic pain, arising from nerve injury due to trauma or disease, is one of the most difficult challenges in pain management (Finnerup et al., 2010). Despite the increase of knowledge on neurobiological mechanisms underlying the development and maintenance of this neurological disease, it remains difficult to treat with conventional analgesics or anticonvulsants such as morphine, tramadol, and pregabalin (Jensen et al., 2009). Patients coping with neuropathic pain exhibit a wide range of symptoms, the most characteristic manifestations including provoked pain (hyperalgesia and allodynia to thermal and mechanical stimuli) and spontaneous painful sensations (intermittent or continuous) (Gilron et al., 2006). To face health care challenges, there is therefore a high medical need to explore and develop novel treatment modalities to address intractable neuropathic symptoms.

Over the last two decades, the development of preclinical animal models greatly improved our understanding of the neurobiological mechanisms contributing to the generation of neuropathic pain (Wang and Wang, 2003). Peripheral nerve injury procedures where the sciatic nerve is ligated or sectioned are probably the most commonly used chronic models mimicking human neuropathic pain conditions (Jaggi et al., 2009). Among them, a series of recent studies demonstrated the validity of the chronic constriction injury (CCI) model developed by Bennett and Xie (1988) in drug screening. Indeed, it reproduces sensory deficits observed in clinical settings and is sensitive to the array of drugs used for the management of neuropathic pain (De Vry et al., 2004, Dowdall et al., 2005, Pradhan et al., 2010).

Presently, modulation of nociceptive processing by G-protein-coupled receptors (GPCR) represents an attractive therapeutic approach to treat chronic neuropathic pain (Stone and Molliver, 2009). Among these GPCR families, neurotensin (NT) receptors, NTS1 and NTS2, have gained particular attention as potential targets in the therapeutics of pain (Dobner, 2006). Indeed, the peptide NT influences the nociceptive transmission via its actions within ascending and descending pain modulatory circuits (Sarret and Beaudet, 2003, Dobner, 2006). Furthermore, central inhibition of NTS1 and NTS2 functions, by RNAi or antisense approaches or by using NT receptor antagonists, results in hypersensitivity to noxious stimuli (Dubuc et al., 1999, Buhler et al., 2005, Dore-Savard et al., 2008).

A growing body of reports supported the role played by NTS1 receptors in pain regulation. Thus, stable analogs of NT that activate NTS1 induce profound analgesia after spinal or supraspinal delivery (Buhler et al., 2008, Hughes et al., 2010, Rossi et al., 2010). Accordingly, we demonstrated that the recruitment of NTS1 mediated the antinociceptive effects of NT in rodent models of persistent pain with the use of the formalin test (Roussy et al., 2008, Roussy et al., 2010). Despite accumulating evidence of the involvement of NTS1 receptors in NT-induced analgesia, there is, however, little information about their potential implication for reducing chronic pain. Here, we therefore attempted to determine the efficacy of NTS1 in treating neuropathic pain. For this purpose, we have characterized the effects of NTS1 agonists, injected at the spinal level, on the development of tactile allodynia and thermal hyperalgesia in CCI-injured rats.

## MATERIAL and METHODS

### *Animals and housing conditions*

Adult male Sprague-Dawley rats, weighing 225-275 g (Charles River laboratories, St-Constant, Canada), were housed four to a cage on Aspen shavings in a quiet room and kept on a 12 h light/dark cycle with free access to food and water. Room temperature and relative humidity were maintained at  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $50 \pm 5\%$ , respectively. Animals were acclimatized to the laboratory conditions for at least 7 days prior to surgery. All procedures were approved by the Animal Care Committee of the *Université de Sherbrooke* and were in accordance with policies and directives of the Canadian Council on Animal Care and the International Association for the Study of Pain (IASP) guidelines for pain research in animals.

### *Surgical procedures*

Neuropathic pain was induced through chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve, as previously described (Bennett and Xie, 1988). Briefly, under isoflurane anaesthesia (5% in O<sub>2</sub>; Abbott Laboratories, Montreal, QC, Canada), the rat was placed in left lateral recumbency, and a 2.5 cm longitudinal skin incision was made starting at the sciatic notch. The right common sciatic nerve was exposed at the mid-thigh level by blunt dissection through the biceps femoris muscle. Proximal to the sciatic nerve's trifurcation, 7 mm of nerve was freed from adhering tissues, and four ligatures were loosely tied around it with about 1 mm of spacing (4.0 Sofsilk suture). The wound was then closed in layers and

the skin was sealed with 4.0 silk sutures. This right side was defined as the operated-ipsilateral limb, while the non-operated leg (left) represented the contralateral side. Great care was taken to tie the ligatures such as the diameter of the sciatic nerve was seen to be just barely constricted, when viewed under a dissecting microscope. Sham-operated animals underwent the same surgical procedure, except that the sciatic nerve was not ligated. Rectal temperature was maintained at  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  by using a heating pad and ophthalmic ointment was used to prevent corneal desiccation. Rats were housed individually for 48 h following surgery. The animals were randomly assigned to CCI or sham-operated groups.

#### *Nociceptive behavioral testing*

Thermal hyperalgesia (increased response to a painful stimulus) and mechanical allodynia (pain produced by a stimulus that is not normally painful) were used as outcome measures of neuropathic pain and as indicators of a drug's analgesic efficacy. On each testing day, rats were individually placed in one of the three separated Plexiglas containers and allowed to accommodate to the environment for 10 min. Behavioral assessment was performed, by the same experimenter, 1 day before surgery (BL) and 3, 7, 14, 21, and 28 days post-surgery.

Thermal hypersensitivity of the hind limbs was measured with the use of the plantar test (Ugo Basile, Italy), according to the method previously described (Hargreaves et al., 1988). Briefly, a radiant noxious heat source was applied through the glass onto the mid-plantar surface of the hind paws. The time elapsed between onset of the stimulus and manifestation of the paw withdrawal response was automatically recorded and considered

as an index of the heat nociceptive threshold. The intensity of the mobile infrared photobeam was adjusted to 50 Hz to result in withdrawal latencies of 13-14 s before surgery. A cut-off time of 30 s was imposed to prevent tissue damage. The hind paws were tested alternately with 5 min intervals between consecutive tests. The five measurements of latency per paw were averaged. Attention was given to make sure that no urine interfered between the glass floor and the plantar surface of the hind paws.

Mechanical allodynia was first evaluated bilaterally as described previously (Chaplan et al., 1994). To measure rat hind paw mechanical threshold, animals were placed into compartment enclosures in a test chamber with a framed metal mesh floor. Sensitivity to light touch was then determined using the Dynamic Plantar Aesthesiometer (DPA, Stoelting, USA). This electronic von Frey device applied a single filament (0.5 mm in diameter) on the mid-plantar surface of the hind paw. The preset force increases linearly from 1 to 50 g over a 20 s period (2.5g/s). The paw withdrawal response automatically turned off the stimulus, and the paw withdrawal threshold (PWT) eliciting the response was recorded. 50 g was considered as the cut-off. Five successive stimuli were alternately applied to both ipsi- and contralateral hind paws at 30 sec intervals.

### *Drugs*

The effectiveness of acute treatments with NTS1 receptor agonists on neuropathic pain-related behaviors was investigated on CCI rats between postoperative days 3 and 28. Intrathecal (i.t.) administration of drugs was accomplished by acute lumbar puncture between the L5 and L6 vertebrae, while rats were lightly anaesthetized with isoflurane. A volume of 25  $\mu$ l of drug in solution or physiological saline was i.t. injected over a 15 s period with the use of a Hamilton syringe fitted to a 27½ gauge needle. The occurrence of

a tail flick upon needle insertion indicates the appropriate positioning of the needle in the intrathecal space. Pharmacological testing was performed with different doses of the brain penetrating NTS1 agonists, PD149163 [Lys(CH<sub>2</sub>NH)Lys-Pro-Trp-*tert*-Leu-Leu-OEt] (30 and 90 µg/kg), obtained from the National Institute of Mental Health through Chemical Synthesis and Drug Supply Program, and NT69L [*N*-methyl-Arg, Lys, Pro, L-*neo*-Trp, *tert*-Leu, Leu] (5 and 25 µg/kg) obtained from Dr Elliott Richelson, as well as with NT (6 µg/kg, Bachem Bioscience Inc, PA, USA). All chemicals were dissolved in physiological saline. Rats were placed in the DPA device 10-min post-injection and were tested 10 – 40 min. later.

#### *Statistical analysis*

All data are expressed as means ± SEM. Analyses were performed with GraphPad Prism 5.d software. Statistical analyses were performed using a two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test or using one-way analysis of variance followed by Dunnett's post-test. A *P*-value < 0.05 was considered statistically significant. The percentage of anti-allodynia was calculated with the area under the curve of every treatment for the whole tested period (28 days), with the use of the following equation: % *anti-allodynia* = 100 × [(*Post-drug* – *Pre-Drug latencies*) / (*Sham* – *Pre-Drug latencies*)]. From the latter formula, 0% represents no anti-allodynic effect of the compound, while 100% corresponds to a complete relief of mechanical hypersensitivity. 'Post-drug' represents values obtained with CCI groups after injection of one of the NT receptor agonists. 'Pre-drug' corresponds to values obtained with CCI groups prior to injection.

## RESULTS

### *General behavioral observations*

Following sciatic nerve injury, all neuropathic rats exhibited abnormal posture of the affected limb. Previously described by others (Hofmann et al., 2003, De Vry et al., 2004), these characteristic postural deficiencies included lifting of the ipsilateral hind paw, loss of normal spread and ventroflexion of the toes, walking with the medial edge of the hind paw, and mild foot drop. General behavior and social interactions were unchanged for CCI rats compared to those for sham-operated or naive animals. With the exception of weight gain stagnation in the CCI group during the first three postoperative days, body weight increased normally as predicted by the growth chart. Spontaneous pain-related behaviors were also observed within 2 days following the surgery, but started to decline after the 14<sup>th</sup> postoperative day. These behaviors included ipsilateral hind paw lifting, flinching, shaking, licking, guarding, and preferential weight bearing on the contralateral paw. Autotomy of the operated paw did not occur over the 28-day period. No spontaneous nociceptive-related behaviors were observed in the hind paws of sham-operated rats or in the contralateral side of CCI rats. No adverse events, such as respiratory distress, paralysis, or sedation occurred following intrathecal administration of the three drugs at any doses tested. We only observed a rapid (within 30 s) but transient (<10 min) change in ear, foot, and tail color to light blue corresponding to vasoconstriction at the highest doses of NT69L and PD149163, as previously reported (Boules et al., 2006). At the doses used, the repeated administration of PD149163 did not induce motor symptoms or locomotor deficiency. The time spent on the rotarod and the distance traveled in the open field were similar to the values monitored with the control group (data not shown).

*Temporal development of behavioral nociceptive responses following peripheral nerve injury-induced neuropathy*

The time course of two behavioral endpoints to heat and punctate mechanical stimuli were examined in sham and in CCI-operated rats during the 4-week period following the surgery. As shown in Fig. 1, rats subjected to loose ligation of the sciatic nerve developed both thermal hyperalgesia and tactile allodynia. Thermal hyperalgesia was represented by a decreased paw withdrawal latency (PWL) of the ipsilateral hind paw in response to a noxious radiant heat stimulus (Fig. 1A). CCI rats exhibited thermal hyperalgesia 3-7 days post-surgery ( $14 \pm 1$  and  $9.9 \pm 0.4$  sec, respectively for baselines before and 7 days after nerve injury), and this hypersensitivity was maintained for 28 days ( $P < 0.001$ ; Figs. 1A, B). The weak reduction in PWL over 28 days for the contralateral paw was not significantly different from the baseline values (Fig. 1A). PWL were also stable throughout the 4-week testing period in sham animals (Fig. 1B).

In turn, mechanical hypersensitivity was evidenced on day 3 post-surgery by a reduced paw withdrawal threshold (PWT) compared to baseline pre-surgery values ( $29 \pm 1$  and  $43 \pm 2$  g, respectively,  $P < 0.001$ ; Figs. 1C, D). A significant 30% to 40% decrease of the mechano-nociceptive threshold of the affected limb was observed during the first three weeks following the surgery, after which PWT returned progressively to baseline levels. Over time, CCI rats displayed no change in withdrawal thresholds on the contralateral hind paw (Fig. 1C). Furthermore, sham-operated rats did not develop hypersensitivity to innocuous mechanical stimulation of the plantar dermatome innervated by the sciatic nerve (Fig. 1D). Overall, CCI contralateral paw withdrawal latency and pressure values were similar to those of sham for both hind paws (data not shown).

*Anti-hyperalgesic effects of NTS1 agonists in the chronic constriction injury neuropathic pain model*

To determine whether activation of spinal NTS1 would reverse neuropathic pain behaviors in nerve-injured rats, NTS1 agonists were acutely administered into the lumbar intrathecal space on days, 3, 7, 14, 21, and 28 post-surgery. Acute i.t. delivery of NT (6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) significantly attenuated thermal hyperalgesia secondary to nerve injury at days, 14, 21, and 28 following surgery, showing a return to baseline values ( $***P < 0.001$ ; Fig. 2A). At this dose, NT induced significant increases in PWL on the contralateral side between pre-drug and post-drug profiles, only at day 28 (Fig. 2D). However, it is important to note that contralateral post-drug latencies were not significantly different from baseline pre-surgery values, therefore revealing normal nociceptive levels (Fig. 2D). Heat hyperalgesia produced by CCI of the sciatic nerve was also fully reversed by the two doses of PD149163 tested (Fig. 2B). Indeed, 30 and 90  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of PD149163 significantly alleviated the behavioral responses to radiant heat stimuli over the 28-day period, even exerting an antinociceptive effect ( $P < 0.001$ ; Fig. 2B). This compound had repercussions on the contralateral PWL as well, leading to a similar insensitivity to radiant stimuli above baseline values at both 30 and 90  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Fig 2D). We also found that the nerve injury-induced thermal hypersensitivity was responsive to NT69L treatment (Fig. 2C). Both NT69L doses induced a maximal thermal analgesic effect, marked by a return to baseline values, and a weak effect on the contralateral paw (Fig. 2D).

*Anti-allodynic effects of NTS1 agonists in the chronic constriction injury neuropathic pain model*

Next, we investigated the effects of intrathecally administered NTS1 agonists on CCI-induced mechanical allodynia. Acute i.t. injection of NT (6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) produced a significant increase in mechanical withdrawal thresholds in CCI rats (except for day 21; Fig. 3A). At this dose, NT exerted a maximum anti-allodynic effect of 91% ( $***P < 0.001$ ; Fig. 4) over the entire treatment period (28 days). I.t. delivery of the NTS1-selective agonist, PD149163 also reversed the allodynic state (Fig. 3B). Indeed, doses of 30 and 90  $\mu\text{g}/\text{kg}$  induced a 78% ( $*P < 0.05$ ) and 116% ( $***P < 0.001$ ) recovery, respectively (Fig. 4). As shown in Fig. 4, the increase in PWL thresholds following the injection of 90  $\mu\text{g}/\text{kg}$  PD149163 in CCI rats exceeded the pre-surgery threshold level, indicative of a weak antinociceptive action. Tactile allodynia induced by nerve injury was also responsive to the NT69L treatment. Both doses tested (5 and 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) effectively suppressed the CCI-induced allodynia in rats (Fig. 3C). Nevertheless, it seemed that the highest dose of NT69L provided less pain relief than the lowest dose of agonist, with a maximal reversal of 98% at 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $***P < 0.001$ ; Fig. 4). The effectiveness of acute administration of the NTS1 agonists was also examined on the contralateral side over the 28-day period. As shown in Fig. 3D, there was a significant effect of NT treatment on the withdrawal threshold contralateral to the surgery over the 4-week trial, although the analgesic effect was less than that for the ipsilateral side (Fig. 3A). Weak antinociceptive effects of administered NTS1 agonists, PD149163 and NT69L were also observed contralaterally, at the doses previously shown to exert the highest effects on the ipsilateral side (Fig. 3D).

## DISCUSSION

To date, of all clinically marketed drugs, close to 40% are modulators of G-protein-coupled receptors (Stone and Molliver, 2009). Consequently, GPCR targeting remains an attractive therapeutic research area to develop treatments for chronic neuropathic pain. In the present study, we demonstrated that the spinal GPCR NTS1 is one of the signaling systems that might contribute to the regulation of nociceptive transmission in a context of neuropathic pain. Indeed, we found that intrathecal delivery of NTS1 agonists reversed both thermal and mechanical hypersensitivity after peripheral nerve injury.

Chronic neuropathic pain arising from peripheral nerve damage is a severe clinical issue for which there is a major unmet medical need (Dray, 2008, Finnerup et al., 2010). Improvements in chronic pain management are actually required, as two-thirds of neuropathic pain patients are poorly relieved with the current therapies (Jensen 2009). Despite the potential of emerging technologies as alternative therapeutic strategies (e.g. antisense- and RNA interference-based approaches) (Rohl and Kurreck, 2006, Goss et al., 2007, Sarret et al., 2010a, Sarret et al., 2010b), the pharmacological management still represents the main option for treating chronic neuropathic pain. Tricyclic antidepressants, serotonin/noradrenaline reuptake inhibitors, the anticonvulsants gabapentin and pregabalin, and opioids are currently prescribed drugs to manage symptoms of neuropathic pain (Jensen et al., 2009, Finnerup et al., 2010). In particular, opioid analgesics have shown efficacy in several randomized clinical trials involving patients with different etiologies of neuropathic pain (Dworkin et al., 2010). However, their routine use in clinical practice is quite limited by long-term safety concerns including abuse, physical dependence and

development of side effects such as constipation, nausea, cognitive impairment, and sedation (Benyamin et al., 2008).

Over the last two decades, we and others have demonstrated that the transmission of pain information is strongly influenced by the activity of the neurotensinergic system (Sarret and Beaudet, 2003, Dobner, 2006). Of particular interest is that NT-induced analgesia operates independently of the endogenous opioid system. Indeed, it was pharmacologically demonstrated that the antinociceptive responses induced by NT or NT receptor agonists could not be reversed by the two structurally related opioid antagonists, naloxone and naltrexone (Clineschmidt and McGuffin, 1977, Nemeroff et al., 1979, Behbehani and Pert, 1984, Bredeloux et al., 2006). Similarly, rats treated with antisense peptide nucleic acids targeting the mu opioid receptor maintained a normal antinociceptive response to NT (McMahon et al., 2001). Furthermore, recent studies with NT antagonists and knockout mice lacking NT or NT receptors have revealed that the neurotensinergic system plays a pivotal role in the non-opioid form of stress-induced analgesia (Seta et al., 2001, Gui et al., 2004, Lafrance et al., 2010). Based on these data, it appears that NT-induced pain suppression is, at least in part, generated by distinct mechanisms from those of the opioid peptides, and may therefore represent a potential new therapeutic option for the treatment of persistent/chronic pain. Moreover, since analgesic synergy has been reported to occur between opioid and NT systems (Boules et al., 2009), drug combinations might provide better pain relief without causing dose-related adverse effects.

Thus, the present study aimed at investigating the role of spinal NTS1 in the regulation of neuropathic pain hypersensitivity. To test this possibility, we monitored over a 28-day period the pain-related behaviors in sciatic nerve-injured animals following acute intrathecal delivery of NTS1 agonists. First of all, both mechanical allodynia and thermal

hyperalgesia developed rapidly within one week post-CCI surgery. These results are consistent with previously published reports, including the original one described by Bennett and Xie (Bennett and Xie, 1988, Kim et al., 1997, De Vry et al., 2004, Dowdall et al., 2005). Thereafter, the decrease in paw withdrawal latency in response to noxious radiant heat stimuli remained reliably constant throughout the experiment. In contrast, the paw withdrawal threshold, as measured with the use of the dynamic plantar aesthesiometer, dropped to its minimum at day 7 post-surgery before gradually returning to preoperative values at the end of the observation period. Variability in temporal response profiles to tactile stimuli has been observed in the chronic constriction injury model (Kim et al., 1997, De Vry et al., 2004, Dowdall et al., 2005, Robinson and Meert, 2005, Pradhan et al., 2010). Onset, duration and magnitude of the evoked response may be related to internal or external factors (e.g. housing, diet, bedding, sex, species and strain difference, evaluation methods) that can affect the development of neuropathic pain (Chesler et al., 2002). For example, the suture material used for the loose ligation of the sciatic nerve can lead to distinct behavioral outcomes with regard to sensory deficits (Luukko et al., 1994, Robinson and Meert, 2005). In addition, as previously reported by others (Bennett and Xie, 1988, De Vry et al., 2004), we found no significant changes in the time course of the withdrawal threshold of the hind paw contralateral to the unilateral sciatic nerve constriction. The development of mirror image pain on the contralateral side has, however, been observed following peripheral nerve lesions, such as in the spared nerve injury (Erichsen and Blackburn-Munro, 2002), spinal nerve ligation (Kim and Chung, 1992), cuff-implanted sciatic nerve (Pitcher et al., 1999), and partial sciatic nerve injury (Seltzer et al., 1990) models.

Our results further reveal a critical role for NTS1 in the reduction of CCI-induced neuropathic pain symptoms. Indeed, acute intrathecal administration of the NTS1-specific

agonist PD149163 prolonged the response latencies to radiant heat stimuli in the Hargreaves test. Likewise, its spinal injection almost completely reversed mechanical allodynia in CCI rats. On the other hand, NT69L, showing equivalent affinities for both NTS1 and NTS2 receptors (Roussy et al., 2009), induced a strong analgesic effect in both behavioral endpoints, but only a partial anti-allodynic effect at the highest dose. This dampened effect observed with the 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dose could in part be explained by the existence of functional interactions between NTS1 and NTS2 receptors (Perron et al., 2007, Hwang et al., 2010). Furthermore, since activation of NTS2 receptors has been reported to exert spinal analgesic actions in different pain paradigms (Dubuc et al., 1999, Sarret et al., 2005, Dore-Savard et al., 2008, Roussy et al., 2009, Lafrance et al., 2010), we cannot exclude the possibility that NTS2-selective agonists might also produce anti-hyperalgesic and anti-allodynic effects in a context of neuropathic pain.

The high density of immunolabeling for NTS1 in the superficial laminae of the dorsal horn, as well as the staining of numerous small- and medium-sized dorsal root ganglia neurons is consistent with a predominant role of the NTS1 in the control of incoming nociceptive messages (Roussy et al., 2008). To our knowledge, this is the first demonstration that spinal delivery of NTS1 agonists can adequately alleviate the behavioral signs of neuropathic pain. These results are also in accordance with earlier studies demonstrating the involvement of NTS1 in pain regulation in non-neuropathic painful conditions. Indeed, microinjection of the selective NTS1 agonist, PD149163, into the rostral ventromedial medulla resulted in profound analgesic responses, as measured by the tail-flick test (Buhler et al., 2005, Buhler et al., 2008). Furthermore, mice deficient in or lacking NTS1 failed to exhibit NT-induced antinociception to thermal stimuli (Pettibone et al., 2002). Accordingly, we recently demonstrated that selective NTS1 agonists reduced

the nociceptive behaviors induced by the chemical irritant formalin (Roussy et al., 2008). Despite more than a decade of research, the underlying mechanisms of NTS1-induced analgesia are not fully understood. Nevertheless, recent findings have revealed that activation of NTS1 produced analgesia through pathways that release both serotonin and norepinephrine in the spinal cord (Buhler et al., 2005, Buhler et al., 2008).

Pharmacological validation of the chronic constriction injury model has been previously performed with a number of drugs, which are currently used for the treatment of neuropathic pain in patients (Martin and Eisenach, 2001). However, not all behavioral symptoms related to CCI neuropathy are equally responsive to treatment. For instance, the tricyclic antidepressant amitriptyline significantly attenuates CCI-induced heat hyperalgesia, but has little or no effect on mechanical allodynia (De Vry et al., 2004, Pradhan et al., 2010). Similarly, the anticonvulsant gabapentin was found to be more effective in reversing thermal hyperalgesia than tactile allodynia (Pradhan et al., 2010). This dichotomy in the behavioral endpoints tested is also reported in other neuropathic pain models (Ulugol et al., 2006, Brenchat et al., 2010, Sandor et al., 2010) and suggests that thermal hyperalgesia and mechanical allodynia are two manifestations of neuropathic pain probably relayed by separate neuronal pathways. In reality, tactile allodynia is described to be mediated through large diameter, A $\beta$ -afferent fibers, while heat hypersensitivity is likely to be dependent on the recruitment of unmyelinated C-fibers (Basbaum et al., 2009). In general, it appears that mechanical allodynia is much more difficult to manage than the other stimulus-evoked pain behaviors observed following peripheral nerve injury (Sindrup and Jensen, 1999, Martin and Eisenach, 2001). Interestingly, our findings revealed that tactile allodynia is highly sensitive to NTS1 compounds, therefore suggesting that

administration of NTS1 agonists may clinically improve the condition associated with traumatic nerve injury.

There are now emerging evidences that dynamic and plastic changes in nociceptive conducting pathways participate in the generation and maintenance of chronic pain (Costigan et al., 2009). These alterations include ectopic or spontaneous generation of action potentials, facilitation or disinhibition of synaptic transmission, neuroimmune interaction, and morphological reorganization within both peripheral and central nervous systems. Above all, many neurochemical changes occur in the neuroma and in the cell bodies of dorsal root ganglia neurons following sciatic nerve injury (Woolf and Salter, 2000). For example, these phenotypic changes drive alterations in the expression, trafficking and redistribution of ion channels and receptors involved in pain modulation, and modify the patterns of released neurotransmitters such as substance P and calcitonin gene-related peptide (CGRP) (Wiesenfeld-Hallin and Xu, 1996). The integrity of the neurotensinergic system also seems to be affected in persistent/chronic pain conditions. Indeed, the NT peptide has been shown to be up-regulated in the lumbar spinal cord in response to formalin as well as following neuropathic pain induction (Zhang et al., 1994, Vachon et al., 2004). Moreover, peripheral axotomy increased expression of NT in large sensory neurons (Zhang et al., 1996). In addition to phenotypic changes in the mRNA and protein expression profiles for NT, various modifications also occur in the distribution and expression patterns of NT receptors at the spinal level after noxious stimulation or injury-induced neuropathic pain (Xu et al., 1997, Xiao et al., 2002, Yang et al., 2004, Ren et al., 2005). Altogether, it is thus tempting to speculate that peripheral nerve injury, causing changes in the neurochemical and functional organization of the somatosensory pathways, in particular the up-regulation of the neurotensinergic system in large diameter A $\beta$ -afferent

fibers, drives the high anti-allodynic efficacy of NTS1 analogs in neuropathic pain conditions.

### **Conclusion**

Treating chronic pain remains a great challenge. Patients experiencing painful sensations associated with neuropathic pain usually receive an array of medications not only for their pain but also for the myriad of co-morbid symptoms that may be part of their diagnosis (Turk et al., 2010). Interestingly, NTS1 agonists have been previously described to modulate the neural circuitry involved in the regulation of anxiety and depression disorders (Cervo et al., 1992, Shilling and Feifel, 2008). Given their dual selective actions in pain relief and treatment of psychiatric disorders, NTS1 analogs may therefore be helpful in developing new rational strategies with improved therapeutic benefit and reduced side effect profiles.

**ACKNOWLEDGEMENTS:**

This work is supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, MOP-74618) and the Cancer Research Society (CRS) awarded to P.S. A.G. holds a scholarship from Merck-Frosst and M.A.D. is supported by the Sir Frederick Banting and Dr. Charles Best Canada Graduate Scholarships. P.S. is a CIHR new investigator, director of the Sherbrooke's Neuroscience Centre, and member of the FRSQ-funded Centre de Recherche Clinique Étienne Lebel. The authors thank the National Institute of Mental Health (N.I.M.H) for providing NT compounds. We are also grateful to Marie-Pierre Garant and Nathalie Carrier working at the Centre de Recherche Clinique Etienne-Lebel for their help in statistical analysis.

## REFERENCES

- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 2009;139:267-284.
- Behbehani MM, Pert A A mechanism for the analgesic effect of neurotensin as revealed by behavioral and electrophysiological techniques. *Brain Res* 1984;324:35-42.
- Bennett GJ, Xie YK A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988;33:87-107.
- Benyamin R, Trescot AM, Datta S, Buenaventura R, Adlaka R, Sehgal N, Glaser SE, Vallejo R Opioid complications and side effects. *Pain Physician* 2008;11:S105-120.
- Boules M, Fredrickson P, Richelson E Bioactive analogs of neurotensin: focus on CNS effects. *Peptides* 2006;27:2523-2533.
- Boules M, Shaw A, Liang Y, Barbut D, Richelson E NT69L, a novel analgesic, shows synergy with morphine. *Brain Res* 2009;1294:22-28.
- Bredeloux P, Costentin J, Dubuc I Interactions between NTS2 neurotensin and opioid receptors on two nociceptive responses assessed on the hot plate test in mice. *Behav Brain Res* 2006;175:399-407.
- Brenchat A, Nadal X, Romero L, Ovalle S, Muro A, Sanchez-Arroyos R, Portillo-Salido E, Pujol M, Montero A, Codony X, Burgueno J, Zamanillo D, Hamon M, Maldonado R, Vela JM Pharmacological activation of 5-HT7 receptors reduces nerve injury-induced mechanical and thermal hypersensitivity. *Pain* 2010;149:483-494.
- Buhler AV, Choi J, Proudfit HK, Gebhart GF Neurotensin activation of the NTR1 on spinally-projecting serotonergic neurons in the rostral ventromedial medulla is antinociceptive. *Pain* 2005;114:285-294.
- Buhler AV, Proudfit HK, Gebhart GF Neurotensin-produced antinociception in the rostral ventromedial medulla is partially mediated by spinal cord norepinephrine. *Pain* 2008;135:280-290.
- Cervo L, Rossi C, Tatarczynska E, Samanin R Antidepressant-like effect of neurotensin administered in the ventral tegmental area in the forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)* 1992;109:369-372.

- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 1994;53:55-63.
- Chesler EJ, Wilson SG, Lariviere WR, Rodriguez-Zas SL, Mogil JS Identification and ranking of genetic and laboratory environment factors influencing a behavioral trait, thermal nociception, via computational analysis of a large data archive. *Neurosci Biobehav Rev* 2002;26:907-923.
- Clineschmidt BV, McGuffin JC Neurotensin administered intracisternally inhibits responsiveness of mice to noxious stimuli. *Eur J Pharmacol* 1977;46:395-396.
- Costigan M, Scholz J, Woolf CJ Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci* 2009;32:1-32.
- De Vry J, Kuhl E, Franken-Kunkel P, Eckel G Pharmacological characterization of the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2004;491:137-148.
- Dobner PR Neurotensin and pain modulation. *Peptides* 2006;27:2405-2414.
- Dore-Savard L, Roussy G, Dansereau MA, Collingwood MA, Lennox KA, Rose SD, Beaudet N, Behlke MA, Sarret P Central delivery of Dicer-substrate siRNA: a direct application for pain research. *Mol Ther* 2008;16:1331-1339.
- Dowdall T, Robinson I, Meert TF Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;80:93-108.
- Dray A Neuropathic pain: emerging treatments. *Br J Anaesth* 2008;101:48-58.
- Dubuc I, Sarret P, Labbe-Jullie C, Botto JM, Honore E, Bourdel E, Martinez J, Costentin J, Vincent JP, Kitabgi P, Mazella J Identification of the receptor subtype involved in the analgesic effect of neurotensin. *J Neurosci* 1999;19:503-510.
- Dworkin RH, O'Connor AB, Audette J, Baron R, Gourlay GK, Haanpaa ML, Kent JL, Krane EJ, Lebel AA, Levy RM, Mackey SC, Mayer J, Miaskowski C, Raja SN, Rice AS, Schmader KE, Stacey B, Stanos S, Treede RD, Turk DC, Walco GA, Wells CD Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. *Mayo Clin Proc* 2010;85:S3-14.
- Erichsen HK, Blackburn-Munro G Pharmacological characterisation of the spared nerve injury model of neuropathic pain. *Pain* 2002;98:151-161.

- Finnerup NB, Sindrup SH, Jensen TS The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. *Pain* 2010;150:573-581.
- Gilron I, Watson CP, Cahill CM, Moulin DE Neuropathic pain: a practical guide for the clinician. *CMAJ* 2006;175:265-275.
- Goss JR, Goins WF, Glorioso JC Gene therapy applications for the treatment of neuropathic pain. *Expert Rev Neurother* 2007;7:487-506.
- Gui X, Carraway RE, Dobner PR Endogenous neurotensin facilitates visceral nociception and is required for stress-induced antinociception in mice and rats. *Neuroscience* 2004;126:1023-1032.
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 1988;32:77-88.
- Hofmann HA, De Vry J, Siegling A, Spreyer P, Denzer D Pharmacological sensitivity and gene expression analysis of the tibial nerve injury model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2003;470:17-25.
- Hughes FM, Jr., Shaner BE, May LA, Zotian L, Brower JO, Woods RJ, Cash M, Morrow D, Massa F, Mazella J, Dix TA Identification and functional characterization of a stable, centrally active derivative of the neurotensin (8-13) fragment as a potential first-in-class analgesic. *J Med Chem* 2010;53:4623-4632.
- Hwang JR, Baek MW, Sim J, Choi HS, Han JM, Kim YL, Hwang JI, Kwon HB, Beaudet N, Sarret P, Seong JY Intermolecular cross-talk between NTR1 and NTR2 neurotensin receptor promotes intracellular sequestration and functional inhibition of NTR1 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391:1007-1013.
- Jaggi AS, Jain V, Singh N Animal models of neuropathic pain. *Fundam Clin Pharmacol* 2009.
- Jensen TS, Madsen CS, Finnerup NB Pharmacology and treatment of neuropathic pains. *Curr Opin Neurol* 2009;22:467-474.
- Kim KJ, Yoon YW, Chung JM Comparison of three rodent neuropathic pain models. *Exp Brain Res* 1997;113:200-206.
- Kim SH, Chung JM An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 1992;50:355-363.

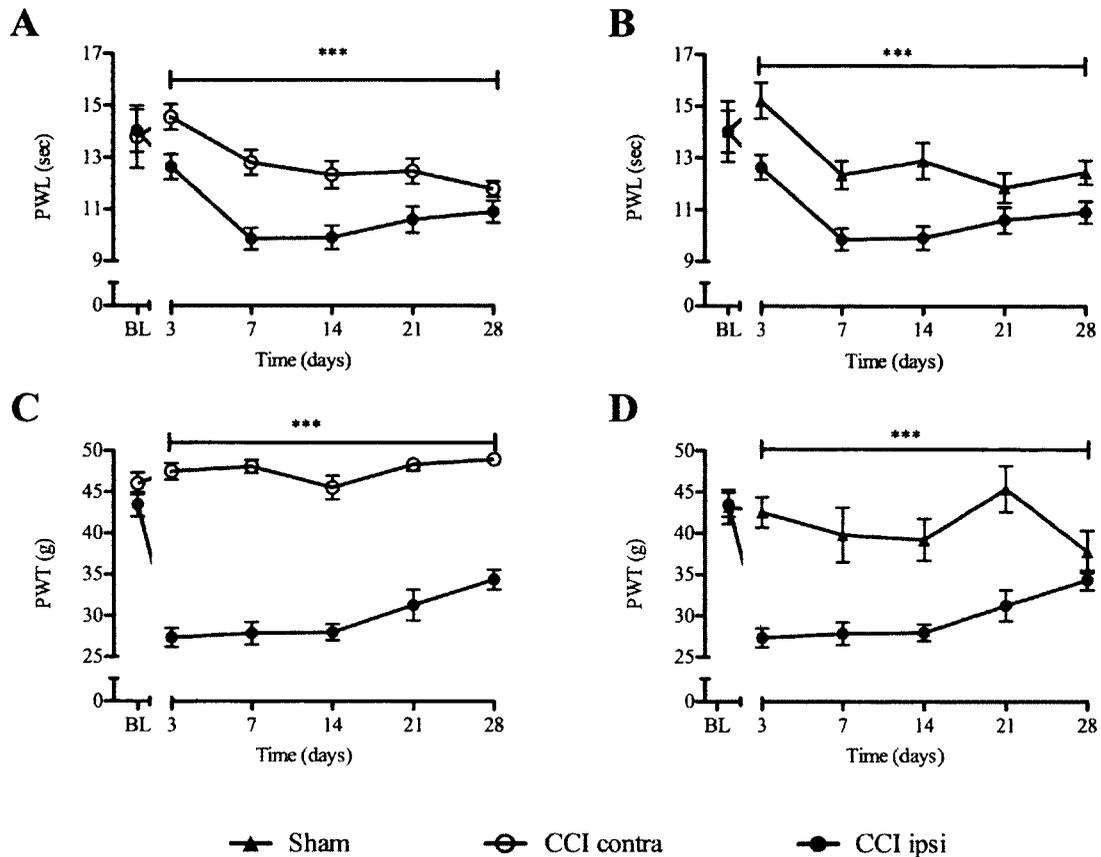
- Lafrance M, Roussy G, Belleville K, Maeno H, Beaudet N, Wada K, Sarret P Involvement of NTS2 receptors in stress-induced analgesia. *Neuroscience* 2010;166:639-652.
- Luukko M, Konttinen Y, Kemppinen P, Pertovaara A Influence of various experimental parameters on the incidence of thermal and mechanical hyperalgesia induced by a constriction mononeuropathy of the sciatic nerve in lightly anesthetized rats. *Exp Neurol* 1994;128:143-154.
- Martin TJ, Eisenach JC Pharmacology of opioid and nonopioid analgesics in chronic pain states. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299:811-817.
- McMahon BM, Stewart JA, Jackson J, Fauq A, McCormick DJ, Richelson E Intraperitoneal injection of antisense peptide nucleic acids targeted to the mu receptor decreases response to morphine and receptor protein levels in rat brain. *Brain Res* 2001;904:345-349.
- Nemeroff CB, Osbahr AJ, 3rd, Manberg PJ, Ervin GN, Prange AJ, Jr. Alterations in nociception and body temperature after intracisternal administration of neurotensin, beta-endorphin, other endogenous peptides, and morphine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:5368-5371.
- Perron A, Sharif N, Sarret P, Stroh T, Beaudet A NTS2 modulates the intracellular distribution and trafficking of NTS1 via heterodimerization. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;353:582-590.
- Pettibone DJ, Hess JF, Hey PJ, Jacobson MA, Leviten M, Lis EV, Mallorga PJ, Pascarella DM, Snyder MA, Williams JB, Zeng Z The effects of deleting the mouse neurotensin receptor NTR1 on central and peripheral responses to neurotensin. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;300:305-313.
- Pitcher GM, Ritchie J, Henry JL Nerve constriction in the rat: model of neuropathic, surgical and central pain. *Pain* 1999;83:37-46.
- Pradhan AA, Yu XH, Laird JM Modality of hyperalgesia tested, not type of nerve damage, predicts pharmacological sensitivity in rat models of neuropathic pain. *Eur J Pain* 2010;14:503-509.
- Ren K, Novikova SI, He F, Dubner R, Lidow MS Neonatal local noxious insult affects gene expression in the spinal dorsal horn of adult rats. *Mol Pain* 2005;1:27.

- Robinson I, Meert TF Stability of neuropathic pain symptoms in partial sciatic nerve ligation in rats is affected by suture material. *Neurosci Lett* 2005;373:125-129.
- Rohl T, Kurreck J RNA interference in pain research. *J Neurochem* 2006;99:371-380.
- Rossi GC, Matulonis JE, Richelson E, Barbut D, Pasternak GW Systemically and topically active antinociceptive neurotensin compounds. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;334:1075-1079.
- Roussy G, Beaudry H, Lafrance M, Belleville K, Beaudet N, Wada K, Gendron L, Sarret P Altered morphine-induced analgesia in neurotensin type 1 receptor null mice. *Neuroscience* 2010;170:1286-1294.
- Roussy G, Dansereau MA, Baudisson S, Ezzoubaa F, Belleville K, Beaudet N, Martinez J, Richelson E, Sarret P Evidence for a role of NTS2 receptors in the modulation of tonic pain sensitivity. *Mol Pain* 2009;5:38.
- Roussy G, Dansereau MA, Dore-Savard L, Belleville K, Beaudet N, Richelson E, Sarret P Spinal NTS1 receptors regulate nociceptive signaling in a rat formalin tonic pain model. *J Neurochem* 2008;105:1100-1114.
- Sandor K, Kormos V, Botz B, Imreh A, Bolcskei K, Gaszner B, Markovics A, Szolcsanyi J, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Reglodi D, Helyes Z Impaired nocifensive behaviours and mechanical hyperalgesia, but enhanced thermal allodynia in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide deficient mice. *Neuropeptides* 2010;44:363-371.
- Sarret P, Beaudet A Neurotensin receptors in the central nervous system. *Handbook of chemical neuroanatomy* 2003;Vol. 20. Peptide Receptors, Part II. Amsterdam: Elsevier:323-400.
- Sarret P, Dore-Savard L, Beaudet N Direct application of siRNA for in vivo pain research. *Methods Mol Biol* 2010a;623:383-395.
- Sarret P, Dore-Savard L, Tetreault P, Bégin-Lavallée V, Beaudet N Application of Dicer-Substrate siRNA in Pain Research *RNA Technologies* 2010b;V.A. Erdmann and J. Barciszewski (eds.), *RNA Technologies and Their Applications*,:161-190.
- Sarret P, Esdaile MJ, Perron A, Martinez J, Stroh T, Beaudet A Potent spinal analgesia elicited through stimulation of NTS2 neurotensin receptors. *J Neurosci* 2005;25:8188-8196.

- Seltzer Z, Dubner R, Shir Y A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 1990;43:205-218.
- Seta KA, Jansen HT, Kreitel KD, Lehman M, Behbehani MM Cold water swim stress increases the expression of neurotensin mRNA in the lateral hypothalamus and medial preoptic regions of the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;86:145-152.
- Shilling PD, Feifel D The neurotensin-1 receptor agonist PD149163 blocks fear-potentiated startle. *Pharmacol Biochem Behav* 2008;90:748-752.
- Sindrup SH, Jensen TS Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: an update and effect related to mechanism of drug action. *Pain* 1999;83:389-400.
- Stone LS, Molliver DC In search of analgesia: emerging roles of GPCRs in pain. *Mol Interv* 2009;9:234-251.
- Turk DC, Audette J, Levy RM, Mackey SC, Stanos S Assessment and treatment of psychosocial comorbidities in patients with neuropathic pain. *Mayo Clin Proc* 2010;85:S42-50.
- Ulugol A, Dokmeci D, Guray G, Sapolyo N, Ozyigit F, Tamer M Antihyperalgesic, but not antiallodynic, effect of melatonin in nerve-injured neuropathic mice: Possible involvements of the L-arginine-NO pathway and opioid system. *Life Sci* 2006;78:1592-1597.
- Vachon P, Masse R, Gibbs BF Substance P and neurotensin are up-regulated in the lumbar spinal cord of animals with neuropathic pain. *Can J Vet Res* 2004;68:86-92.
- Wang LX, Wang ZJ Animal and cellular models of chronic pain. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:949-965.
- Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ Plasticity of messenger function in primary afferents following nerve injury--implications for neuropathic pain. *Prog Brain Res* 1996;110:113-124.
- Woolf CJ, Salter MW Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 2000;288:1765-1769.
- Xiao HS, Huang QH, Zhang FX, Bao L, Lu YJ, Guo C, Yang L, Huang WJ, Fu G, Xu SH, Cheng XP, Yan Q, Zhu ZD, Zhang X, Chen Z, Han ZG Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:8360-8365.

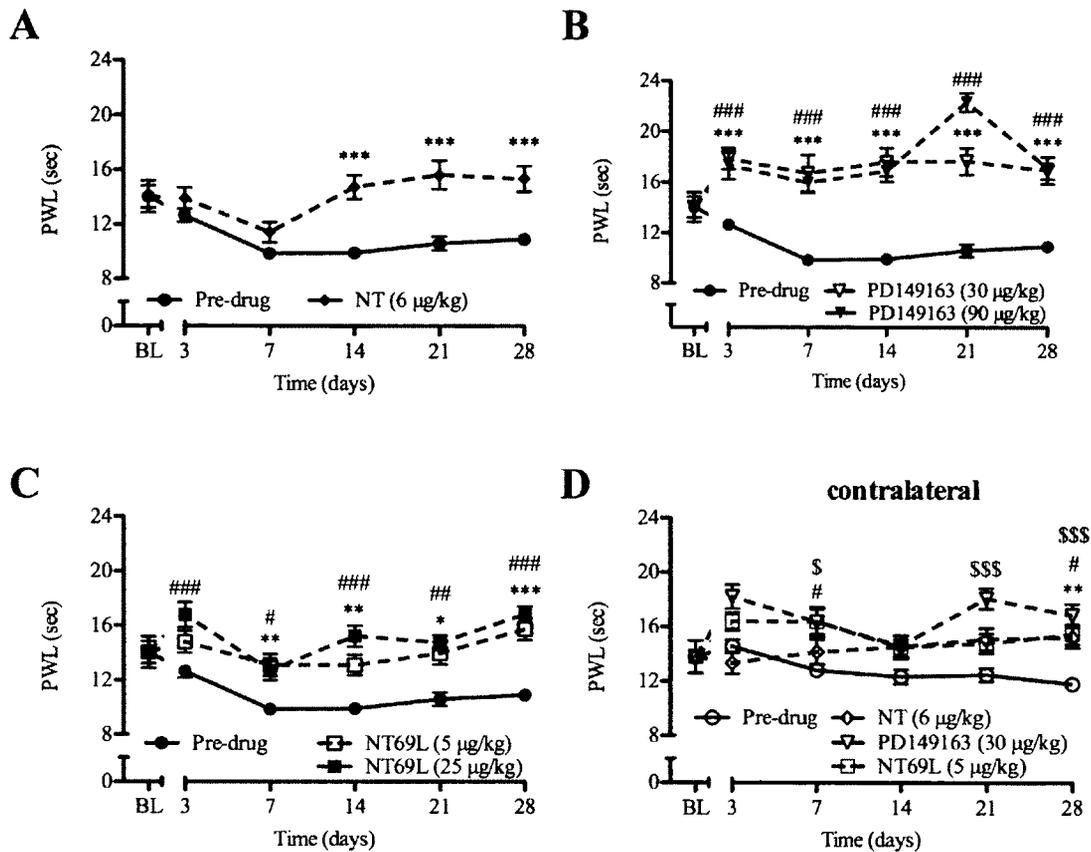
- Xu ZQ, Zhang X, Grillner S, Hokfelt T Electrophysiological studies on rat dorsal root ganglion neurons after peripheral axotomy: changes in responses to neuropeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:13262-13266.
- Yang L, Zhang FX, Huang F, Lu YJ, Li GD, Bao L, Xiao HS, Zhang X Peripheral nerve injury induces trans-synaptic modification of channels, receptors and signal pathways in rat dorsal spinal cord. *European Journal of Neuroscience* 2004;19:871-883.
- Zhang RX, Mi ZP, Qiao JT Changes of spinal substance P, calcitonin gene-related peptide, somatostatin, Met-enkephalin and neurotensin in rats in response to formalin-induced pain. *Regul Pept* 1994;51:25-32.
- Zhang X, Bao L, Xu ZQ, Diez M, Frey P, Hokfelt T Peripheral axotomy induces increased expression of neurotensin in large neurons in rat lumbar dorsal root ganglia. *Neurosci Res* 1996;25:359-369.

## FIGURES



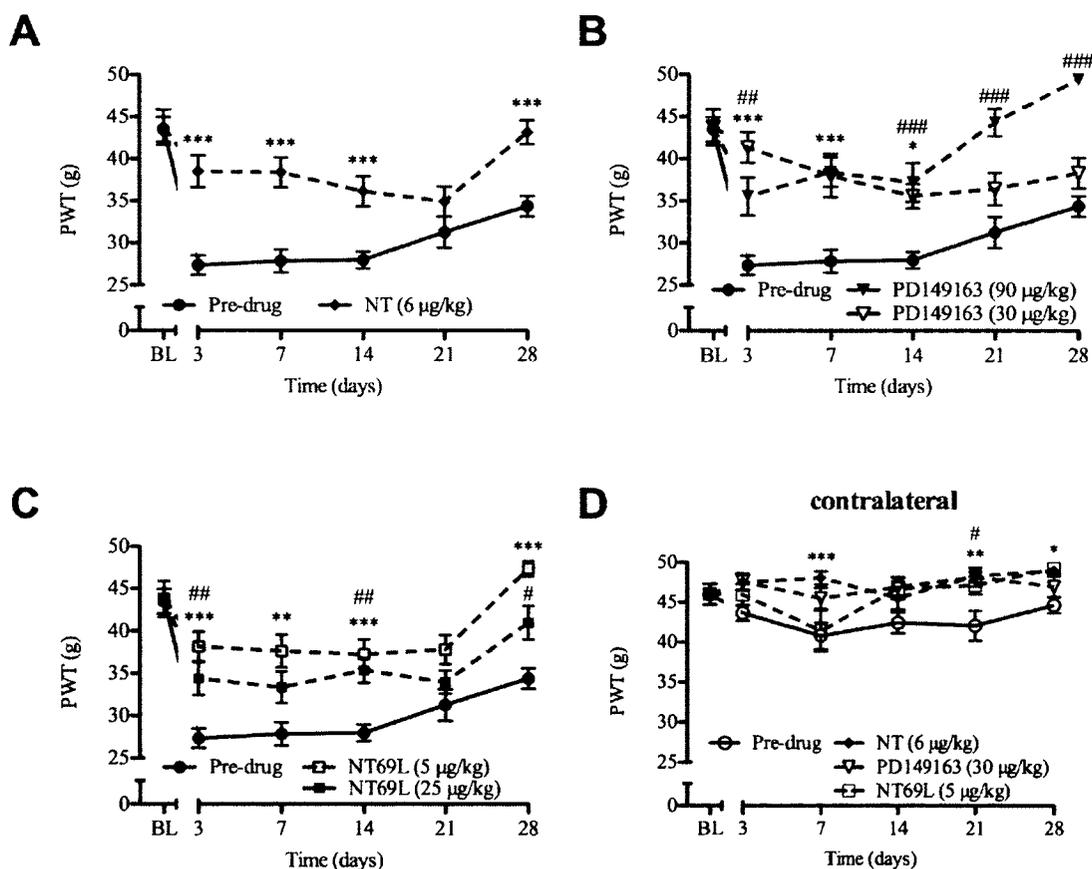
**Figure 1:** Time course of CCI-induced neuropathic pain behaviors. Development of thermal hyperalgesia (A, B) and mechanical allodynia (C, D) induced by chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve in rats. Baseline (BL) hind paw withdrawal thresholds were determined for all CCI- and sham-operated animals prior to surgery. Changes in withdrawal latency to thermal stimulation and withdrawal threshold to mechanical stimulation with von Frey hair were assessed on both ipsilateral and contralateral hind paws of CCI and sham groups, at days 3, 7, 14, 21, and 28 post-surgery. All data represent means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 28$  in the CCI group and  $n = 11$  in the sham group). A two-way ANOVA was used to verify the validity of the model over time;  $***P < 0.001$ .

Bonferonni's post-test verified the significance at individual days for hyperalgesia (A,B; day 3, 7 and 14), and for allodynia (C, all days vs contralateral paw; D, day 3 to 21 vs sham).



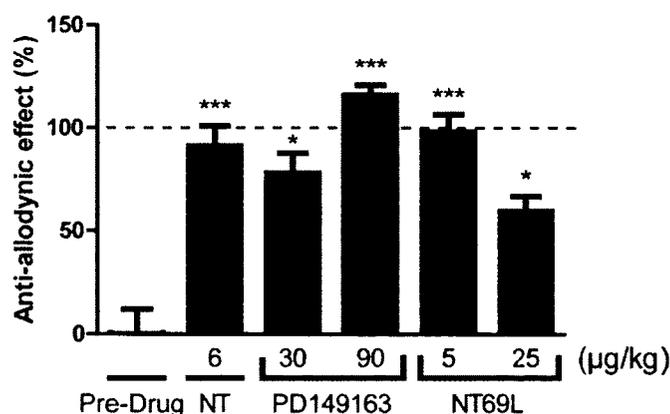
**Figure 2:** Effects of NTS1 agonists on thermal hyperalgesia induced by CCI of the sciatic nerve in rats. Thermal hypersensitivity was observed by a decreased withdrawal latency of the hind paw in response to a noxious radiant heat stimulus. The time course of thermal hyperalgesia was examined on both ipsi- (A, B, C) and contralateral (D) hind paws in CCI-operated rats during the 4-week period after the surgery. NT (6 µg/kg; A), PD149163 (30 and 90 µg/kg; B), and NT69L (5 and 25 µg/kg; C) fully reversed heat hyperalgesia following acute intrathecal delivery. BL indicates baseline prior to surgery. Vertical bars

represent S.E.M. (n = 6-8 per group). Data were analyzed statistically using a two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  and  $***P < 0.001$  compared NT (6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), PD149163 (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), and NT69L (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) to corresponding pre-drug thresholds at each time point.  $\#P < 0.05$ ,  $\#\#P < 0.01$  and  $\#\#\#P < 0.001$  compared PD149163 (90  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) and NT69L (25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) to corresponding pre-drug values at each time point. Antinociceptive effects of administered NTS1 agonists were also observed on the contralateral side (D). For the contralateral paw, symbols \*, #, and \$ denote significant differences for NT, NT69L, and PD149163 to corresponding pre-drug values, respectively.



**Figure 3:** Effects of NTS1 agonists on tactile allodynia induced by CCI of the sciatic nerve in rats. Mechanical hypersensitivity assessed by determining a withdrawal response to

innocuous mechanical stimulation of the hind paw ipsi- (A, B, C) or contralateral (D) to the sciatic nerve injury. Paw withdrawal thresholds were determined at days 3, 7, 14, 21, and 28 post-surgery following acute intrathecal administration of the NTS1 agonists, NT (6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; A), PD149163 (30 and 90  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; B), and NT69L (5 and 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; C). BL indicates baseline prior to surgery. CCI-induced mechanical allodynia was highly sensitive to NTS1 agonist treatment. The error bars represent S.E.M. ( $n = 6-8$  per group). Data were subjected to statistical analysis using a two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  and  $***P < 0.001$  comparing NT (6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), PD149163 (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), and NT69L (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) to corresponding pre-drug thresholds at each time point.  $\#P < 0.05$ ,  $\#\#P < 0.01$  and  $\#\#\#P < 0.001$  comparing PD149163 (90  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) and NT69L (25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) to corresponding pre-drug values at each time point. On the contralateral side (D), symbols \* and # denote significant difference for NT and PD149163 compared to pre-drug values, respectively.



**Figure 4:** Anti-allodynic actions of intrathecal administration of NTS1 agonists. NT, PD149163, and NT69L's anti-allodynic effects are expressed as the percentage of maximum antinociceptive effect over the entire treatment period (28 days), where 100%

corresponds to a complete reversal of mechanical hypersensitivity (indicated by the dotted line). Pre-drug corresponds to values obtained with CCI groups before drug injection. Data are shown as means  $\pm$  S.E.M.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  and  $***P < 0.001$  versus CCI rats. Statistical analyses were performed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's t test.

## 12.0 DISCUSSION

### 12.1 Choix du modèle

Nous avons choisi le modèle de constriction chronique du sciatique puisqu'il fut le premier modèle chirurgical largement reconnu dans la littérature reproduisant une douleur neuropathique chez le rat (Pitcher et al., 1999). Parmi les modèles chirurgicaux, il détient le record de publications et donc, d'informations à son sujet. Il est facile et rapide à effectuer par une personne expérimentée. Il est un modèle valide pour tester les nouveaux traitements pharmacologiques en douleur neuropathique puisque la plupart des médicaments utilisés actuellement chez l'humain pour cette indication (opiacé, tramadol, AED, AD tricyclique, cannabinoïde, AINS) ont été étudiés chez les rats ayant subi la procédure et diminuent significativement l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique (De Vry et al., 2004). Il est encore très utilisé de nos jours.

Le modèle de ligature partielle du nerf saphène est un modèle intéressant pour l'avenir. Il possède l'avantage d'être dépourvu d'effets moteurs (Walczak et al., 2005). Par contre, ce sont les comportements de douleur spontanée qui peuvent être incommodants lors de tests comportementaux et non pas l'handicap moteur. De plus, le modèle de ligature partielle du nerf saphène n'a pas été choisi puisqu'au moment où ce projet de recherche a été réalisé, il venait tout juste d'être décrit et il n'y avait que l'article initial publié dans la littérature à son sujet. Finalement, le territoire du nerf saphène sur la patte arrière du rat est limité à sa portion médiale, ce qui limite considérablement la superficie d'application du stimulus douloureux dans les tests comportementaux de douleur comparativement au territoire sensitif du nerf sciatique qui comprend la portion centrale et latérale de la patte.

## 12.2 Modifications au modèle

Deux variantes ont été apportées au modèle tel que décrit dans la littérature (Wiley et al., 2003). Tout d'abord, au lieu d'utiliser du fil chirurgical 'chromic gut' pour faire les ligatures, du fil de soie fut utilisé. Le 'chromic gut' utilisé dans la publication initiale est un fil résorbable, rigide et donc, difficile à manipuler. Dans le 'Current Protocols in Pharmacology', il est dit qu'il est préférable d'utiliser ce dernier puisque certains articles soulignent que la réaction inflammatoire qui lui est associée participerait au développement du comportement douloureux (Maves et al., 1993). En effet, le 'chromic gut' est dégradé au site de la ligature par protéolyse à l'intérieur d'une dizaine de jours et cela crée une réaction inflammatoire légère. Pourtant, un autre article démontre qu'il n'y a pas de différence dans le développement de comportement douloureux et dans la réaction inflammatoire entraînée par une ligature faite avec du 'chromic gut' versus du fil de soie (Luukko et al., 1994). Le fil de soie est un fil non résorbable, il est plus souple que le 'chromic gut' et il fut donc plus facile de bien faire les ligatures lâches.

Ensuite, au lieu d'effectuer la procédure sham sur la patte controlatérale, nous l'avons fait sur un autre groupe de rats, du même côté que les rats ayant subi la ligature. Le sham demeure ainsi un type contrôle tout en permettant d'évaluer les effets controlatéraux des 2 procédures.

## 12.3 Choix du contrôle, effets controlatéraux et effet de la procédure sham

Pour démontrer le développement de douleur neuropathique de la patte opérée, elle fut comparée avec la patte controlatérale de même qu'avec la patte sham (Fig. 1 de l'article). Tel que rapporté dans la littérature (Bennett et al., 1988, De Vry et al., 2004), nous n'avons pas mis en évidence d'hyperalgésie ni d'allodynie dans les pattes controlatérales et les pattes sham. Certains auteurs ont toutefois rapporté le développement d'une image miroir de la douleur, c'est-à-dire une douleur dans la patte non-opérée controlatérale et que subséquemment, cette dernière ne constituerait pas un contrôle approprié.

Par exemple, Seltzer et al. ont rapporté une allodynie mécanique bilatérale débutant au jour 1 post-opératoire et persistant plus de 54 jours dans son modèle de ligature partielle du sciatique (Seltzer et al., 1990). Tandis que Pitcher et al. ont démontré une allodynie

mécanique controlatérale dans une variante du modèle de constriction chronique du sciatique utilisant une prothèse de polyéthylène pour effectuer la constriction du nerf (Pitcher et al., 1999).

Nous avons quand même choisi ces contrôles puisqu'ils permettent de distinguer les effets reliés directement à la ligature, des effets reliés aux autres étapes de la chirurgie chez les sham. De plus, il n'existe pas de meilleur contrôle pour le moment.

#### **12.4 Effets de la chirurgie**

Les effets moteurs et les comportements de douleur spontanée furent tels que décrits dans la littérature (Bennett et al., 1988). Les comportements de douleur spontanée étaient parfois incommodants puisque nous testions des molécules aux demi-vies courtes et qu'il arrivait que nous devions attendre quelques instants avant de continuer les tests comportementaux. Par exemple, l'animal pouvait garder sa patte en position protégée près de sa hanche ou la lécher pendant un moment. Deux rats ont même dû être exclus des données aux jours 3 et 7 puisque cela empêchait de les tester correctement. Par contre, quoique incommodants, ces comportements reflètent bien la réalité de la douleur neuropathique et leurs équivalents sont rencontrés chez l'humain (McMahon et al., 2006). Heureusement, ils tendaient à disparaître à partir de 14 jours postopératoires.

Au niveau de la patte opérée sham, aucun effet moteur ni comportement de douleur spontanée n'ont été observés, cela atteste que le nerf n'a pas été lésé par accident chez ces sujets.

Le développement de douleur neuropathique (allodynie et hyperalgésie) fut tel que décrit dans la littérature, c'est-à-dire se développant à l'intérieur de 7 jours et présent tout au long des tests comportementaux (Bennett et al., 1988) (Fig. 1A et 1C de l'article). Cependant, le poids toléré au retrait de la patte fut à son minimum à 7 jours (plus ce dernier est faible, plus l'animal est allodynique) et augmenta progressivement par la suite (Fig. 1C de l'article). Cela a eu pour conséquence que la différence de poids au retrait de la patte entre la patte opérée et la patte controlatérale demeura significative tout au long des tests. Par contre, ce n'était plus le cas au jour 28 postopératoire, entre la patte opérée et la patte sham (Fig. 1D de l'article). Cela est peut-être la conséquence d'une trop faible tension donnée aux ligatures. En effet, lors des ligatures il faut donner une tension suffisante pour qu'il y

ait développement de douleur neuropathique tout en évitant une tension trop grande qui entraînerait trop de douleur spontanée (Wiley et al., 2004).

### **12.5 Effet analgésique des agonistes neurotensinergiques**

En douleur aiguë, l'effet analgésique de la NT est bien documenté chez le rat et la souris tant au niveau spinal que supraspinal. Au niveau spinal, en IT la NT augmente le seuil de douleur dans plusieurs tests évaluant la douleur aiguë (Clineschmidt et al., 1982; Martin et al., 1982; Spampinato et al., 1988; Yaksh et al., 1982). En supraspinal, on observe également une analgésie lorsque la NT est injectée dans la SGPA et dans le bulbe rostroventral (Benmoussa et al., 1996; Kalivas et al., 1982; Urban et al., 1993). En douleur aiguë, le cumulatif des études suggèrent la participation des 2 récepteurs, NTR1 et NTR2, dans l'analgésie induite par la NT (pour plus de détails, se référer à l'introduction p. 34).

Dans un modèle de douleur tonique induite par la formaline, il a été démontré que la NT, le NT69L ainsi que le PD149163 exerçaient un effet analgésique dose-dépendant (Roussy et al., 2008). De plus, cet article démontre la participation des 2 récepteurs, NTR1 et NTR2, dans l'analgésie induite par la NT en douleur tonique puisque l'antagoniste du récepteur NTR1, le SR48692, inhibe entièrement l'analgésie induite par le PD149163 tandis qu'il exerce qu'une inhibition partielle de l'analgésie induite par le NT69L.

L'hypothèse avancée pour expliquer l'analgésie induite par la NT découle de plusieurs études et est la suivante : la douleur constitue un stress intense qui stimule l'hypothalamus. L'hypothalamus envoie des afférences neurotensinergiques à la SGPA qui elle-même envoie des afférences neurotensinergiques au bulbe rostroventral. Dans le bulbe rostroventral, des neurones à projection spinale exprimant le récepteur NTR1 et contenant de la sérotonine seraient activés et complèteraient le contrôle inhibiteur descendant en activant des interneurons inhibiteurs dans la corne dorsale de la moelle (Dobner, 2005, 2006). Notons qu'on retrouve également les récepteurs NTR1 et NTR2 dans la couche I et II de la corne dorsale de la moelle (Jennes et al., 1982; Sarret et al., 2005) (pour plus de détails, se référer à l'introduction p. 35).

Dans notre modèle animal, nous avons observé un effet analgésique constant de la NT et de ses analogues peptidiques, NT69L et PD149163, sur la douleur neuropathique de la patte opérée (Fig 2 et 3 de l'article). À notre connaissance, il s'agit du 1<sup>er</sup> article qui le démontre

en douleur neuropathique. En effet, contrairement à la littérature abondante corroborant l'effet analgésique de la NT en douleur aiguë, il existe peu de littérature concernant la NT et la douleur neuropathique et aucune étude concernant l'effet analgésique de la NT en douleur neuropathique.

Sur les pattes ipsilatérales, l'effet fut observé dans le test qui évaluait l'allodynie et dans celui qui évaluait l'hyperalgésie (Fig 2A, 2C, 2E et 3A, 3C, 3E de l'Article). Toutefois, l'effet était plus constant en hyperalgésie et c'est probablement en lien avec une diminution de l'allodynie de manière progressive à partir du 7<sup>e</sup> jour postopératoire.

Sur les pattes controlatérales, un effet analgésique de plus petite magnitude fut également observé dans le test qui évaluait l'allodynie et dans celui qui évaluait l'hyperalgésie (Fig 2B, 2D, 2F et 3B, 3D, 3F de l'article). Tel que cité précédemment, nous n'avons pas mis en évidence d'hyperalgésie ni d'allodynie aux pattes controlatérales. Logiquement, on peut déduire que l'effet observé des agonistes neurotensinergiques sur les pattes controlatérales représente une analgésie en douleur aiguë, soit une augmentation du seuil de douleur dans des tests de douleur aiguë (Clineschmidt et al., 1982; Martin et al., 1982; Spampinato et al., 1988; Yaksh et al., 1982).

Le PD149163, un agoniste spécifique du récepteur NTR1, a amené un effet analgésique dose-dépendant important (Fig 2C et 3C et 4 de l'article). Puisqu'il est un agoniste spécifique pour NTR1, nous nous sommes questionnés sur la possibilité que ce récepteur soit davantage impliqué dans l'effet analgésique de la NT. D'un autre côté, le NT69L, qui présente des affinités équivalentes pour les récepteurs NTR1 et NTR2 (Roussy et al., 2009), a induit un effet analgésique important tant en allodynie qu'en hyperalgésie à la plus faible dose, mais seulement un effet partiel anti-allodynique à la plus forte dose (Fig. 2E et 3E de l'article). Cet effet moindre avec la dose de 25 µg/kg pourrait être expliqué en partie par l'existence d'interactions fonctionnelles entre les récepteurs NTR1 et NTR2. Toutefois, nous n'avons pas effectué de tests avec des agonistes spécifiques pour NTR2. Nous pouvons donc faire des hypothèses et suspecter un effet analgésique plus important des agonistes NTR1 mais nous ne pouvons tirer une conclusion claire à cet effet.

## 12.6 Autres effets observés

Nous avons noté d'autres effets des agonistes neurotensinergiques, tous déjà été rapportés dans la littérature.

Tout d'abord, nous avons remarqué que lors de l'administration IT de NT69L et de PD149163, il se produisait une vasodilatation rapide mais transitoire (~10 minutes), des petits vaisseaux visibles au niveau des oreilles, du pourtour de la bouche et des pattes du rat. Celle-ci semblait absente toutefois lors de l'administration de NT. Cet effet avait déjà été rapporté mais seulement lors de l'administration iv de la NT (Carraway et al., 1973). Il est probable que les 2 analogues peptidiques, qui ont une tendance lipophile, lorsque injectés en intrathécal se redistribuent dans le compartiment vasculaire et entraînent ainsi une vasodilatation. Alors que la NT, à tendance hydrophile, reste quant à elle presque totalement dans l'espace IT. Elle n'est donc pas absorbée dans le compartiment vasculaire et par conséquent, n'entraîne pas de vasodilatation.

Malgré cette vasodilatation transitoire et le fait que nous n'ayons pas mesuré la tension artérielle de nos rats, nous savons que la tension artérielle n'est pas descendue sous un seuil critique puisque nos rats sont demeurés bien conscients et continuaient à se comporter normalement. Ils étaient donc aptes à répondre aux stimuli nociceptifs que nous leur présentions.

Deuxièmement, nous avons notés une hypothermie à 30 minutes suite à l'injection IT de NT69L et PD149163 mais non objectivée suite à l'injection de NT. Cette hypothermie variait entre 34.5 et 35.5°C, la température normale étant entre 35.9 et 37.5°C. Nous avons émis l'hypothèse qu'elle survenait le plus probablement suite à une redistribution dans le compartiment vasculaire de ces composés à tendance lipophiles secondairement à la vasodilatation des petits vaisseaux et la perte de chaleur qui lui est associée.

Toutefois, nous savons que l'hypothermie en soi n'a pas d'influence sur l'effet analgésique de la NT lors de tests de douleur aiguë utilisant des stimuli thermiques. En effet, l'hypothermie induite par d'autres drogues (chlorpromazine, 5-hydroxytryptophan ou oxotremorine) n'entraîne pas de changement au test de la plaque chaude (Clineschmidt et al., 1979).

Finalement, nous avons observé une diminution de l'activité locomotrice spontanée suite à l'injection de NT et de ses analogues peptidiques. Cette trouvaille était toutefois plus

marquée avec les analogues. Nous croyons que malgré une diminution de l'activité locomotrice spontanée, les rats maintiennent une coordination motrice et un équilibre normal et demeurent aptes à répondre à un stimulus. En effet, dans une étude sur des souris publiée en 1979, on démontrait que, malgré une diminution de l'activité locomotrice mesurée quantitativement, lorsque soumises au test du rotarod (test qui évalue la capacité de demeurer sur un bâton de 2.5 cm de diamètre qui tourne) les souris maintiennent des performances normales même sous l'effet de très fortes doses de NT (Clineschmidt et al., 1979).

### **12.7 Efficacité des agonistes neurotensinergiques en comparaison à des médicaments efficaces cliniquement en douleur neuropathique**

À ce jour, aucune étude n'a comparé directement l'efficacité des agonistes neurotensinergiques à des médicaments reconnus efficaces en clinique. Mentionnons toutefois que Nemeroff démontra que la NT s'avère plus efficace que la morphine dans le traitement de la douleur aiguë chez la souris (Nemeroff et al., 1979). De plus, en 2004, De Vry et al., dans son étude avait testé différentes médications utilisées en douleur neuropathique chez l'humain dans le modèle de constriction chronique du sciatique en allodynie et en hyperalgésie (De Vry et al., 2004). Il n'est pas possible de comparer les résultats obtenus en allodynie puisque l'appareil utilisé n'était pas le même. Toutefois, selon leurs résultats, la morphine et la carbamazépine à dose optimale soulageait de 69% l'hyperalgésie, tandis que l'amitriptyline à dose optimale soulageait l'hyperalgésie à 72%.

Dans notre étude, 14 jours après cette même chirurgie, la NT 6 µg/kg, le NT69L 25 µg/kg et le PD149163 30 et 90 µg/kg soulage totalement l'hyperalgésie (annexe 1). Ce qui laisse suggérer une efficacité supérieure des agonistes neurotensinergiques en douleur neuropathique comparativement aux molécules les plus efficaces actuellement sur le marché, du moins chez le rat .

## **13.0 CONCLUSION ET PERSPECTIVE**

En conclusion, le traitement de la douleur neuropathique représente un défi clinique réel et important. Actuellement, les molécules considérées en premières lignes dans les

algorithmes de traitement contre la douleur neuropathique telles que le gabapentin et la pregabaline ont une efficacité modérée que chez 50% des utilisateurs. De plus, les effets secondaires tels que somnolence et troubles cognitif sont fréquents. Il est donc impératif d'explorer de nouvelles avenues thérapeutiques.

Dans cette étude nous avons démontré que la neurotensine et ses analogues peptidiques NT69L et PD149163 sont très efficaces pour renverser l'allodynie et l'hyperalgésie, deux manifestations fréquentes de la douleur neuropathique, dans un modèle validé de douleur neuropathique chez le rat. Le PD149163, agoniste spécifique du NTR1 semblait avoir plus d'effet que les autres agonistes. La douleur chronique entraîne des troubles comorbides de dépression et de trouble du sommeil. À ce sujet, il est intéressant de noter que les agonistes NTR1 ont été associé avec la modulation des circuits neuronaux impliqués dans la régulation de l'anxiété et de la dépression (Cervo et al., 1992, Shilling et Feifel, 2008). Dans cet optique, les agonistes NTR1 pourrait représenter une nouvelle avenue thérapeutique qui pourrait être efficace tant pour traiter la douleur que pour traiter la dépression qui lui est associée.

Dans un avenir rapproché, il serait très intéressant d'étudier l'effet d'agonistes spécifiques NTR2 (tel que le JMV-431) en douleur neuropathique. De même que de faire l'administration concomitante du PD149163 avec l'antagoniste NTR1, SR48692, pour s'assurer que l'analgésie induite par le PD149163 est renversée. De même, si on veut se rapprocher des études chez l'humain, il serait souhaité d'étudier l'efficacité de molécules administrables par la bouche.

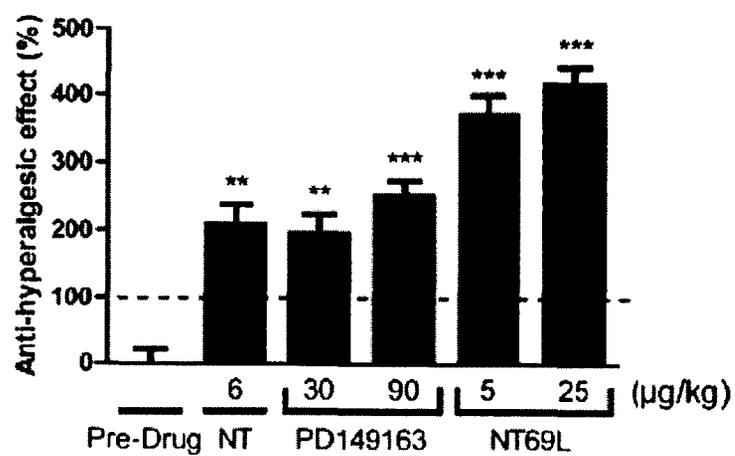
En douleur aiguë, l'analgésie induite par la NT est indépendante des opiacés. Dans le but de mieux caractériser la réponse analgésique induite par la NT en douleur neuropathique, il serait utile de vérifier si cette réponse est indépendante des opiacés en co-administrant du naloxone en même temps que la NT.

Récemment, en douleur aiguë, il a été démontré que l'association de NT69L avec la morphine chez le rat en douleur aiguë avait un effet synergétique permettant d'augmenter

l'effet analgésique tout en réduisant les effets secondaires de chacune des substances (Boules et al., 2009). Il serait intéressant d'étudier cette synergie en douleur neuropathique.

À l'aide de techniques de PCR quantitatif et des techniques immunohistochimiques, nous pourrions étudier les modifications de l'expression neuronale (NTR1 et NTR2) et gliale (NTR2) des récepteurs de la NT dans la moelle et dans les DRG à différents moments suite à la chirurgie de CCI dans le but de mieux caractériser la réponse de ces récepteurs suite à une douleur neuropathique.

## ANNEXE 1



## REMERCIEMENTS

En premier lieu, je remercie le département de physiologie et de biophysique, de même que l'Université de Sherbrooke pour m'avoir accordé une session supplémentaire me permettant ainsi de compléter mon mémoire. En effet, j'ai entrepris un projet de maîtrise durant une pause de 1 an de résidence en médecine. Le chemin pour arriver à terminer ce projet fut long et ardu, mais satisfaisant en soi.

Je remercie mon jury de mémoire. Tout d'abord, mon directeur de recherche, le Dr Philippe Sarret, pour m'avoir accueillie dans son équipe. Lorsque j'ai débuté ma maîtrise, nous étions seulement quatre étudiants dans son laboratoire. Je savais toutefois qu'il n'en serait pas ainsi pour longtemps. En effet, Philippe est un excellent directeur de recherche. Il démontre beaucoup de disponibilité malgré ses lourdes tâches. Il est patient et tolérant mais sait user judicieusement de fermeté pour nous pousser plus loin. Il est également un bon pédagogue.

Je remercie le Dr David Fortin et le Dr Serge Marchand pour avoir accepté, malgré leur horaire chargé, d'être jury de mon mémoire. J'admire ses deux êtres tant au niveau professionnel que humain. Ils ont en commun d'être des passionnés, d'avoir beaucoup de talent et de bonnes idées et d'être profondément charismatiques.

Je remercie Nicolas Beudet, assistant de recherche du Dr Philippe pour son travail acharné, sa débrouillardise et la disponibilité dont il a fait preuve pour répondre à mes questions. Sans lui, le laboratoire du Dr Sarret ne serait pas le même.

Je remercie également mes collègues du temps, Geneviève Roussy et Marc-André Dansereau, ainsi que notre technicienne en santé animale Karine Belleville, pour leur soutien, leurs bons conseils et nos complicités du temps.

Enfin, je remercie le département de médecine interne, la compagnie Merck Frosst ainsi que la bourse du doyen qui m'ont gracieusement offert le financement pour compléter cette année de maîtrise.

## LISTE DES RÉFÉRENCES

- A.P.E.S. Guide pratique des soins palliatifs: gestion de la douleur et autre symptômes, 3e ed. 2002.
- Anderson K. D., Gunawan A., et al. Quantitative assessment of forelimb motor function after cervical spinal cord injury in rats: relationship to the corticospinal tract. *Exp Neurol* 2005;194(1):161-74.
- Arnstein P. Chronic neuropathic pain: issues in patient education. *Pain Manag Nurs* 2004;5(4 Suppl 1):34-41.
- Baker M. D. and Wood J. N. Involvement of Na<sup>+</sup> channels in pain pathways. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22(1):27-31.
- Bass N. H. and Lundborg P. Postnatal development of bulk flow in the cerebrospinal fluid system of the albino rat: clearance of carboxyl-(14 C)inulin after intrathecal infusion. *Brain Res* 1973;52:323-32.
- Bean A. J., Dagerlind A., et al. Cloning of human neurotensin/neuromedin N genomic sequences and expression in the ventral mesencephalon of schizophrenics and age/sex matched controls. *Neuroscience* 1992;50(2):259-68.
- Benarroch E., Westmoreland B., et al. *Medical Neurosciences: an approach to anatomy, pathology, and physiology by systems and levels*. 4th ed. Rochester, 1999.
- Beniczky S., Tajti J., et al. Evidence-based pharmacological treatment of neuropathic pain syndromes. *J Neural Transm* 2005;112(6):735-49.
- Benmoussa M., Chait A., et al. Low doses of neurotensin in the preoptic area produce hyperthermia. Comparison with other brain sites and with neurotensin-induced analgesia. *Brain Res Bull* 1996;39(5):275-9.
- Bennett G. J. Neuropathic pain: a crisis of definition? *Anesth Analg* 2003;97(3):619-20.
- Bennett G. J. and Xie Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988;33(1):87-107.
- Beydoun A. and Backonja M. M. Mechanistic stratification of antineuralgic agents. *J Pain Symptom Manage* 2003;25(5 Suppl):S18-30.
- Blenk K. H., Habler H. J., et al. Neomycin and gadolinium applied to an L5 spinal nerve lesion prevent mechanical allodynia-like behaviour in rats. *Pain* 1997;70(2-3):155-65.

- Botto J. M., Chabry J., et al. Stable expression of the mouse levocabastine-sensitive neurotensin receptor in HEK 293 cell line: binding properties, photoaffinity labeling, and internalization mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;243(2):585-90.
- Boules M., Shaw A., et al. NT69L, a novel analgesic, shows synergy with morphine. *Brain research* 2009; 22-28.
- Boules M., Fredrickson P., et al. Bioactive analogs of neurotensin: Focus on CNS effects. *Peptides* 2006;27(10):2523-33.
- Buhler A. V., Choi J., et al. Neurotensin activation of the NTR1 on spinally-projecting serotonergic neurons in the rostral ventromedial medulla is antinociceptive. *Pain* 2005;114(1-2):285-94.
- Burns D., London J., et al. A.E. Bennett Award Paper. A kinetic analysis of 5-hydroxyindoleacetic acid excretion from rat brain and csf. *Biol Psychiatry* 1976;11(2):125-57.
- Campbell I. G., Carstens E., et al. Comparison of human pain sensation and flexion withdrawal evoked by noxious radiant heat. *Pain* 1991;45(3):259-68.
- Campbell J. N., Meyer R. A., et al. Sensitization of myelinated nociceptive afferents that innervate monkey hand. *J Neurophysiol* 1979;42(6):1669-79.
- Carraway R. and Leeman S. E. The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *J Biol Chem* 1973;248(19):6854-61.
- Carraway R. and Leeman S. E. The amino acid sequence of a hypothalamic peptide, neurotensin. *J Biol Chem* 1975;250(5):1907-11.
- Carraway R. and Leeman S. E. Characterization of radioimmunoassayable neurotensin in the rat. Its differential distribution in the central nervous system, small intestine, and stomach. *J Biol Chem* 1976;251(22):7045-52.
- Carraway R. and Leeman S. E. Radioimmunoassay for neurotensin, a hypothalamic peptide. *J Biol Chem* 1976;251(22):7035-44.
- Chabry J., Botto J. M., et al. Thr-422 and Tyr-424 residues in the carboxyl terminus are critical for the internalization of the rat neurotensin receptor. *J Biol Chem* 1995;270(6):2439-42.
- Chalon P., Vita N., et al. Molecular cloning of a levocabastine-sensitive neurotensin binding site. *FEBS Lett* 1996;386(2-3):91-4.
- Chong M. S. and Bajwa Z. H. Diagnosis and treatment of neuropathic pain. *J Pain Symptom Manage* 2003;25(5 Suppl):S4-S11.

- Clineschmidt B. V., Martin G. E., et al. Antinociceptive effects of neurotensin and neurotensin-related peptides. *Ann N Y Acad Sci* 1982;400:283-306.
- Clineschmidt B. V. and McGuffin J. C. Neurotensin administered intracisternally inhibits responsiveness of mice to noxious stimuli. *Eur J Pharmacol* 1977;46(4):395-6.
- Clineschmidt B. V., McGuffin J. C., et al. Neurotensin: antinociceptive action in rodents. *Eur J Pharmacol* 1979;54(1-2):129-39.
- Cooper P. E., Fernstrom M. H., et al. The regional distribution of somatostatin, substance P and neurotensin in human brain. *Brain Res* 1981;218(1-2):219-32.
- De Vry J., Kuhl E., et al. Pharmacological characterization of the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2004;491(2-3):137-48.
- Decosterd I. and Woolf C. J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 2000;87(2):149-58.
- Devor M. Central changes mediating neuropathic pain. Amsterdam: Elsevier, 1988.
- Diven K. Inhalation Anesthetics in Rodents. *Lab Animal* 2003;32(3):44-7.
- Dobner P. R. Multitasking with neurotensin in the central nervous system. *Cell Mol Life Sci* 2005;62(17):1946-63.
- Dobner P. R. Neurotensin and pain modulation. *Peptides* 2006;27(10):2405-14.
- Dobner P. R., Barber D. L., et al. Cloning and sequence analysis of cDNA for the canine neurotensin/neuromedin N precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(10):3516-20.
- Dubuc I., Costentin J., et al. The nonpeptide neurotensin antagonist, SR 48692, used as a tool to reveal putative neurotensin receptor subtypes. *Br J Pharmacol* 1994;112(2):352-4.
- Dubuc I., Sarret P., et al. Identification of the receptor subtype involved in the analgesic effect of neurotensin. *J Neurosci* 1999;19(1):503-10.
- Dworkin R. H., Backonja M., et al. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *Arch Neurol* 2003;60(11):1524-34.
- Elliott P. J. and Nemeroff C. B. Repeated neurotensin administration in the ventral tegmental area: effects on baseline and D-amphetamine-induced locomotor activity. *Neurosci Lett* 1986;68(2):239-44.

- Feifel D., Melendez G., et al. A systemically administered neurotensin agonist blocks disruption of prepulse inhibition produced by a serotonin-2A agonist. *Neuropsychopharmacology* 2003;28(4):651-3.
- Feifel D., Reza T. L., et al. Novel antipsychotic-like effects on prepulse inhibition of startle produced by a neurotensin agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;288(2):710-3.
- Fields H. L., Bry J., et al. The activity of neurons in the rostral medulla of the rat during withdrawal from noxious heat. *J Neurosci* 1983;3(12):2545-52.
- Gebhart G. F., Sandkuhler J., et al. Inhibition of spinal nociceptive information by stimulation in midbrain of the cat is blocked by lidocaine microinjected in nucleus raphe magnus and medullary reticular formation. *J Neurophysiol* 1983;50(6):1446-59.
- Guirimand F. and Le Bars D. [Physiology of nociception]. *Ann Fr Anesth Reanim* 1996;15(7):1048-79.
- Gully D., Labeeuw B., et al. Biochemical and pharmacological activities of SR 142948A, a new potent neurotensin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280(2):802-12.
- Hammond D. L. Intrathecal administration: methodological considerations. *Prog Brain Res* 1988;77:313-20.
- Handwerker H. O. and Kobal G. Psychophysiology of experimentally induced pain. *Physiol Rev* 1993;73(3):639-71.
- Harden N. and Cohen M. Unmet needs in the management of neuropathic pain. *J Pain Symptom Manage* 2003;25(5 Suppl):S12-7.
- Harden R. N. Chronic neuropathic pain. Mechanisms, diagnosis, and treatment. *Neurologist* 2005;11(2):111-22.
- Hargreaves K., Dubner R., et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 1988;32(1):77-88.
- Heinricher M. M., Cheng Z. F., et al. Evidence for two classes of nociceptive modulating neurons in the periaqueductal gray. *J Neurosci* 1987;7(1):271-8.
- Jaaskelainen S. K. Clinical neurophysiology and quantitative sensory testing in the investigation of orofacial pain and sensory function. *J Orofac Pain* 2004;18(2):85-107.
- Jennes L., Stumpf W. E., et al. Neurotensin: topographical distribution in rat brain by immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 1982;210(3):211-24.

- Kalivas P. W., Gau B. A., et al. Antinociception after microinjection of neurotensin into the central amygdaloid nucleus of the rat. *Brain Res* 1982;243(2):279-86.
- Kauppila T., Kontinen V. K., et al., Weight bearing of the limb as a confounding factor in assessment of mechanical allodynia in the rat. *Pain* 1998; 74: 55-59.
- Kilts C. D., Anderson C. M., et al. Differential effects of antipsychotic drugs on the neurotensin concentration of discrete rat brain nuclei. *Biochem Pharmacol* 1988;37(8):1547-54.
- Kim S. H. and Chung J. M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 1992;50(3):355-63.
- Kitabgi P. Targeting neurotensin receptors with agonists and antagonists for therapeutic purposes. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2002;5(5):764-76.
- Kitabgi P., Carraway R., et al. Neurotensin: specific binding to synaptic membranes from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74(5):1846-50.
- Kitabgi P. and Nemeroff C. *The neurobiology of neurotensin*, Vol. 668: New York Academy of sciences, 1992.
- Koltzenburg M., Wall P. D., et al. Does the right side know what the left is doing? *Trends Neurosci* 1999;22(3):122-7.
- Kona-Boun J.-J., Langlois I., et al. Les rongeurs domestiques. *Le Médecin Vétérinaire du Québec* 2004;34(3):210-9.
- Kozin F., McCarty D. J., et al. The reflex sympathetic dystrophy syndrome. I. Clinical and histologic studies: evidence for bilaterality, response to corticosteroids and articular involvement. *Am J Med* 1976;60(3):321-31.
- Labbe-Jullie C., Dubuc I., et al. In vivo and in vitro structure-activity studies with peptide and pseudopeptide neurotensin analogs suggest the existence of distinct central neurotensin receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;268(1):328-36.
- Lachaine J., Gordon A., et al. Painful neuropathic disorders: An analysis of the Regie de l'Assurance Maladie du Quebec database. *Pain Res Manag* 2007;12(1):31-7.
- Laird J. M. and Bennett G. J. Dorsal root potentials and afferent input to the spinal cord in rats with an experimental peripheral neuropathy. *Brain Res* 1992;584(1-2):181-90.
- LaMotte R. H., Thalhammer J. G., et al. Peripheral neural correlates of magnitude of cutaneous pain and hyperalgesia: a comparison of neural events in monkey with sensory judgments in human. *J Neurophysiol* 1983;50(1):1-26.

- Lewis J. W., Cannon J. T., et al. Opioid and nonopioid mechanisms of stress analgesia. *Science* 1980;208(4444):623-5.
- Luukko M., Konttinen Y., et al. Influence of various experimental parameters on the incidence of thermal and mechanical hyperalgesia induced by a constriction mononeuropathy of the sciatic nerve in lightly anesthetized rats. *Exp Neurol* 1994;128(1):143-54.
- Marondel I., Renault B., et al. Physical mapping of the human neurotensin gene (NTS) between markers D12S1444 and D12S81 on chromosome 12q21. *Genomics* 1996;38(2):243-5.
- Martin G. E. and Naruse T. Differences in the pharmacological actions of intrathecally administered neurotensin and morphine. *Regul Pept* 1982;3(2):97-103.
- Maves T. J., Pechman P. S., et al. Possible chemical contribution from chronic gut sutures produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1993;54(1):57-69.
- Mazella J., Botto J. M., et al. Structure, functional expression, and cerebral localization of the levocabastine-sensitive neurotensin/neuromedin N receptor from mouse brain. *J Neurosci* 1996;16(18):5613-20.
- McMahon S. and Koltzenburg M. Wall and Melzack's Textbook of pain. 5th ed. London, UK: ELSEVIER, 2006.
- McMahon S. and Koltzenburg M. Wall and Melzack's Textbook of Pain. 5th ed. multimedia
- Melzack R. and Wall P. D. Pain mechanisms: a new theory. *Science* 1965;150(699):971-9.
- Menetrey D., Chaouch A., et al. Responses of spinal cord dorsal horn neurones to non-noxious and noxious cutaneous temperature changes in the spinal rat. *Pain* 1979;6(3):265-82.
- Merchant K. M., Dobner P. R., et al. Differential effects of haloperidol and clozapine on neurotensin gene transcription in rat neostriatum. *J Neurosci* 1992;12(2):652-63.
- Merskey H. and Bogduk N. Classification of Chronic Pain (2nd edition). Seattle: IASP Press, 1994.
- Mogil J. S. and Crager S. E. What should we be measuring in behavioral studies of chronic pain in animals? *Pain* 2004;112(1-2):12-5.
- Mokha S. S., Goldsmith G. E., et al. Hypothalamic control of nociceptive and other neurons in the marginal layer of the dorsal horn of the medulla (trigeminal nucleus caudalis) in the rat. *Exp Brain Res* 1987;65(2):427-36.

- Moller K. A., Johansson B., et al. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. *J Neurosci Methods* 1998;84(1-2):41-7.
- Mosconi T. and Kruger L. Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy: ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations. *Pain* 1996;64(1):37-57.
- Namaka M., Gramlich C. R., et al. A treatment algorithm for neuropathic pain. *Clin Ther* 2004;26(7):951-79.
- Nemeroff C. B., Bissette G., et al. Neurotensin: central nervous system effects of a hypothalamic peptide. *Brain Res* 1977;128(3):485-96.
- Nemeroff C. B., Osbahr III AJ, et al. Alterations in nociception and body temperature after intracisternal administration of neurotensin, beta-endorphin, other endogenous peptides, and morphine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 5368-5371.
- Néron A. Les avatars de la douleur: mieux la comprendre pour mieux la soulager, mieux interagir pour mieux la circonscrire. *LE PRATICIEN* 2005;2(7):8-13.
- Neubert M. J., Kincaid W., et al. Nociceptive facilitating neurons in the rostral ventromedial medulla. *Pain* 2004;110(1-2):158-65.
- Osbahr A. J., 3rd, Nemeroff C. B., et al. Neurotensin-induced antinociception in mice: antagonism by thyrotropin-releasing hormone. *J Pharmacol Exp Ther* 1981;217(3):645-51.
- Pettibone D. J., Hess J. F., et al. The effects of deleting the mouse neurotensin receptor NTR1 on central and peripheral responses to neurotensin. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;300(1):305-13.
- Pitcher G. M., Ritchie J., et al. Nerve constriction in the rat: model of neuropathic, surgical and central pain. *Pain* 1999;83(1):37-46.
- Procacci P. and Maresca M. Reflex sympathetic dystrophies and algodystrophies: historical and pathogenic considerations. *Pain* 1987;31(2):137-46.
- Rieselbach R. E., Di Chiro G., et al. Subarachnoid distribution of drugs after lumbar injection. *N Engl J Med* 1962;267:1273-8.
- Rizvi T. A., Murphy A. Z., et al. Medial preoptic area afferents to periaqueductal gray medullo-output neurons: a combined Fos and tract tracing study. *J Neurosci* 1996;16(1):333-44.
- Roussy G., Dansereau M. A., et al. Spinal NTS1 receptors regulate nociceptive signaling in a rat formalin tonic pain model. *J Neurochem* 2008;105(4):1100-14.

- Sarret P., Esdaile M. J., et al. Potent spinal analgesia elicited through stimulation of NTS2 neurotensin receptors. *J Neurosci* 2005;25(36):8188-96.
- Sarret P., Perron A., et al. Immunohistochemical distribution of NTS2 neurotensin receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 2003;461(4):520-38.
- Schaeffer P., Laplace M. C., et al. SR142948A is a potent antagonist of the cardiovascular effects of neurotensin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31(4):545-50.
- Seltzer Z., Dubner R., et al. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 1990;43(2):205-18.
- Semmes J., Weinstein S., et al. *Somatosensory Changes After Penetrating Wounds in Man*. Harvard University Press 1960.
- Seta K. A., Jansen H. T., et al. Cold water swim stress increases the expression of neurotensin mRNA in the lateral hypothalamus and medial preoptic regions of the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;86(1-2):145-52.
- Simone D. A., Sorkin L. S., et al. Neurogenic hyperalgesia: central neural correlates in responses of spinothalamic tract neurons. *J Neurophysiol* 1991;66(1):228-46.
- Smith D. J., Hawranko A. A., et al. Dose-dependent pain-facilitatory and -inhibitory actions of neurotensin are revealed by SR 48692, a nonpeptide neurotensin antagonist: influence on the antinociceptive effect of morphine. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;282(2):899-908.
- Spampinato S., Romualdi P., et al. Distinguishable effects of intrathecal dynorphins, somatostatin, neurotensin and s-calcitonin on nociception and motor function in the rat. *Pain* 1988;35(1):95-104.
- Takaishi K., Eisele J. H., Jr., et al. Behavioral and electrophysiological assessment of hyperalgesia and changes in dorsal horn responses following partial sciatic nerve ligation in rats. *Pain* 1996;66(2-3):297-306.
- Tanaka K., Masu M., et al. Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. *Neuron* 1990;4(6):847-54.
- Torebjork H. E., LaMotte R. H., et al. Peripheral neural correlates of magnitude of cutaneous pain and hyperalgesia: simultaneous recordings in humans of sensory judgments of pain and evoked responses in nociceptors with C-fibers. *J Neurophysiol* 1984;51(2):325-39.
- Tyler-McMahon B. M., Boules M., et al. Neurotensin: peptide for the next millennium. *Regul Pept* 2000;93(1-3):125-36.
- Tyler-McMahon B. M., Stewart J. A., et al. Highly potent neurotensin analog that causes hypothermia and antinociception. *Eur J Pharmacol* 2000;390(1-2):107-11.

- Tyler B. M., Cusack B., et al. Evidence for additional neurotensin receptor subtypes: neurotensin analogs that distinguish between neurotensin-mediated hypothermia and antinociception. *Brain Res* 1998;792(2):246-52.
- Tyler B. M., Jansen K., et al. Peptide nucleic acids targeted to the neurotensin receptor and administered i.p. cross the blood-brain barrier and specifically reduce gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(12):7053-8.
- Ueda H. Molecular mechanisms of neuropathic pain-phenotypic switch and initiation mechanisms. *Pharmacol Ther* 2006;109(1-2):57-77.
- Uhl G. R., Bennett J. P., Jr., et al. Neurotensin, a central nervous system peptide: apparent receptor binding in brain membranes. *Brain Res* 1977;130(2):299-313.
- Urban M. O. and Smith D. J. Role of neurotensin in the nucleus raphe magnus in opioid-induced antinociception from the periaqueductal gray. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;265(2):580-6.
- Vachon P., Masse R., et al. Substance P and neurotensin are up-regulated in the lumbar spinal cord of animals with neuropathic pain. *Can J Vet Res* 2004;68(2):86-92.
- Villetti G., Bergamaschi M., et al. Antinociceptive activity of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist N-(2-Indanyl)-glycinamide hydrochloride (CHF3381) in experimental models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306(2):804-14.
- Vincent J. P., Mazella J., et al. Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20(7):302-9.
- Vita N., Laurent P., et al. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a high affinity human neurotensin receptor. *FEBS Lett* 1993;317(1-2):139-42.
- Vita N., Oury-Donat F., et al. Neurotensin is an antagonist of the human neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Eur J Pharmacol* 1998;360(2-3):265-72.
- Walczak J. S., Pichette V., et al. Behavioral, pharmacological and molecular characterization of the saphenous nerve partial ligation: a new model of neuropathic pain. *Neuroscience* 2005;132(4):1093-102.
- Wall P. D., Devor M., et al. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain* 1979;7(2):103-11.
- Wall P. D., Fitzgerald M., et al. The response of rat spinal cord cells to unmyelinated afferents after peripheral nerve section and after changes in substance P levels. *Neuroscience* 1981;6(11):2205-15.

- Wang L. X. and Wang Z. J. Animal and cellular models of chronic pain. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55(8):949-65.
- Wiley J. and Sons. *Currents Protocols in Pharmacology*, 2003.
- Wiley J. and Sons. *Current Protocols in Neuroscience*. 2004.
- Williams F. G. and Beitz A. J. Chronic pain increases brainstem proneurotensin/neuromedin-N mRNA expression: a hybridization-histochemical and immunohistochemical study using three different rat models for chronic nociception. *Brain Res* 1993;611(1):87-102.
- Wustrow D., Davis M., et al. Reduced amide bond neurotensin 8-13 mimetic with potent in vivo activity. *Bioorg Med Chem Lett* 1995;5:997-1002.
- Xiao H. S., Huang Q. H., et al. Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(12):8360-5.
- Yaksh T. L., Schmauss C., et al. Pharmacological studies on the application, disposition, and release of neurotensin in the spinal cord. *Ann N Y Acad Sci* 1982;400:228-43.
- Yeomans D. C. and Proudfoot H. K. Characterization of the foot withdrawal response to noxious radiant heat in the rat. *Pain* 1994;59(1):85-94.
- Zhang X., Bao L., et al. Peripheral axotomy induces increased expression of neurotensin in large neurons in rat lumbar dorsal root ganglia. *Neurosci Res* 1996;25(4):359-69.
- Zhang X., Xu Z. Q., et al. Complementary distribution of receptors for neurotensin and NPY in small neurons in rat lumbar DRGs and regulation of the receptors and peptides after peripheral axotomy. *J Neurosci* 1995;15(4):2733-47.
- Zimmermann M. Encoding in dorsal horn interneurons receiving noxious and non noxious afferents. *J Physiol (Paris)* 1977;73(3):221-32.
- Zsürger N. *Les récepteurs de la neurotensine chez les mammifères: caractérisation, purification, ontogénèse et vieillissement* 2001.