



**HAL**  
open science

**Traitements précoces et tardifs des douleurs  
neuropathiques et  $\beta$ 2-agonistes : études thérapeutiques  
précliniques et cliniques**

Éric Salvat

► **To cite this version:**

Éric Salvat. Traitements précoces et tardifs des douleurs neuropathiques et  $\beta$ 2-agonistes : études thérapeutiques précliniques et cliniques. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ104 . tel-01374851

**HAL Id: tel-01374851**

**<https://theses.hal.science/tel-01374851>**

Submitted on 2 Oct 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



*École Doctorale des Sciences  
de la Vie et de la Santé*

**THÈSE** présentée par :

**Éric SALVAT**

soutenue le **07 juillet 2014**

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

Spécialité : Neurosciences

---

**Traitements précoces et tardifs des douleurs  
neuropathiques et  $\beta_2$ -agonistes :  
études thérapeutiques précliniques et cliniques**

---

**THÈSE dirigée par :**

**M. Michel BARROT**

Directeur de recherche, CNRS UPR 3212, Strasbourg

**M. André MULLER**

Professeur, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**M. Didier BOUHASSIRA**

Directeur de recherche, Inserm UMR 987, Paris

**M. Luis VILLANUEVA**

Directeur de recherche, Inserm U894, Paris

**EXAMINATEURS :**

**M. Alain Cariou**

Professeur, Hôpital Cochin et Université Paris Descartes

**M. Jérôme De Sèze**

Professeur, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

# Remerciements

---

## A messieurs les membres du jury,

Messieurs **Didier Bouhassira** et **Luis Villanueva**, vous me faites l'honneur de bien vouloir être les rapporteurs de ce travail de thèse, je vous prie de trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon admiration.

Messieurs **Alain Cariou** et **Jérôme De Sèze**, c'est un privilège de vous compter parmi nos juges. Je vous remercie d'avoir accepté d'examiner mon travail, veuillez trouver ici le témoignage de ma gratitude.

Messieurs **Michel Barrot** et **André Muller**, mes directeurs de thèse. Vous avez en commun de m'avoir accueilli dans votre équipe et de m'avoir accordé votre confiance. Vous avez su, tout au long de cette thèse, me transmettre le sens critique nécessaire pour appréhender un travail de recherche. Soyez en infiniment remerciés.

## Merci à tous ceux qui m'ont apporté leur aide et leur soutien, à l'IPCB comme au CETD :

A Mme **Freund-Mercier**, pour sa patience, sa compréhension et le temps consacré à relire mes écrits, depuis le mémoire de Master jusqu'à ce jour,

A Mme **Yalcin-Christmann**, pour son aide dans mes travaux, son grand professionnalisme et sa bonne humeur indéfectible,

A Mr **Veinante**, pour son enthousiasme dans son enseignement, et son énergie,

A toute l'équipe qui m'a accompagné dans mon parcours « labo » : **Betty, Sophie, Yohann, Nada, Florent, Salim, Dorothée, Mélanie, Clémentine, Alice** et **Romain**

A toute l'équipe du CETD, à **Daniel, Benjamin** et **Mirela** qui continuent inlassablement de prendre en charge des patients douloureux chroniques

## A mes proches :

A mes **amis**, Brice et Nicolas, qui m'encouragent de loin

A mes **parents**, qui ont toujours été là,

A **Anne-Claire**, mon épouse, et nos trois magnifiques enfants **Mathilde, Timothée** et **Philémon**, que j'aime tant...

# Publications et communications

---

## Publications liées aux travaux de thèse :

### **The Sciatic Nerve Cuffing Model of Neuropathic Pain in Mice.**

Ipek Yalcin, Salim Megat, Florent Barthas, Elisabeth Waltisperger, Mélanie Kremer, **Eric Salvat**, Michel Barrot

The Journal of Visualized Experiments (JoVE), sous presse.

### **The antiallodynic action of nortriptyline and terbutaline is mediated by $\beta_2$ adrenoceptors and $\delta$ receptors in the ob/ob model of diabetic polyneuropathy.**

Nada Choucair-Jaafar, **Eric Salvat**, Marie-José Freund-Mercier, Michel Barrot

Brain Research, 2014

### **Effects of $\beta_2$ agonists on post-thoracotomy pain incidence.**

**Eric Salvat**, Bérengère Schweitzer, Gilbert Massard, Nicolas Meyer, Frédéric de Blay, André Muller and Michel Barrot

Article soumis

### **Traitements précoces et tardifs de l'allodynie neuropathique : analgésie préventive des antiépileptiques gabapentine et carbamazépine.**

**Eric Salvat**, Ipek Yalcin, André Muller, Michel Barrot

Article en écriture

## Communications affichées :

### **Effects of $\beta_2$ agonists on post-thoracotomy pain incidence.**

**Eric Salvat**, Bérengère Schweitzer, Gilbert Massard, Nicolas Meyer, Frédéric de Blay, André Muller and Michel Barrot

42ème congrès de la Society for Neuroscience, Nouvelle-Orléans, USA, Octobre 2012

### **Effects of $\beta_2$ agonists on post-thoracotomy pain incidence.**

**Eric Salvat**, Bérengère Schweitzer, Gilbert Massard, Nicolas Meyer, Frédéric de Blay, André Muller and Michel Barrot

4th International Congress on Neuropathic Pain, Toronto, Canada, Mai 2013

## Communication orale :

### **Influence des $\beta_2$ -mimétiques sur la survenue de douleurs neuropathiques post-thoracotomie.**

**Eric Salvat**, Bérengère Schweitzer, Gilbert Massard, Nicolas Meyer, Frédéric de Blay, André Muller and Michel Barrot

8ème Symposium du Réseau Inserm de Recherche sur la Douleur, Bordeaux, Mars 2012

# Liste des abréviations

---

AGE	advanced glycation end products
AMM	autorisation de mise sur le marché
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate
ATP	adénosine triphosphate
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
CCI	chronic constriction injury
CIC	centre d'investigation clinique
DCI	dénomination commune internationale
DCPC	douleur chronique post-chirurgicale
DN4	questionnaire douleur neuropathiques en 4 questions
EFNS	european federation of neurological societies
EN	échelle numérique
HUS	hôpitaux universitaires de Strasbourg
IASP	International association for the study of pain
IL	interleukin
IRSNA	inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline
IRSS	inhibiteur spécifique de la recapture de la sérotonine
KCC2	co-transporteur potassium/chlore
LANSS	leeds assessment of neuropathic symptoms and signs
LTP	long-term potentiation
mGluR	récepteur métabotrope du glutamate
NGF	nerve growth factor
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
PHRC	programme hospitalier de recherche clinique

PNL	partial nerve ligation
PSL	partial sciatic ligation
SNI	spared nerve injury
SNL	spinal nerve ligation
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor alpha
TREK	canaux potassium Twik-related K <sup>+</sup>

# Sommaire

---

<b>Introduction : de la douleur à la douleur neuropathique</b>	<b>1</b>
<b>I. Aspects cliniques des douleurs neuropathiques</b>	<b>2</b>
A. Etiologies	2
B. Séméiologie	4
1. Douleurs et sensations anormales	4
2. Déficit sensitif	5
C. Diagnostic	5
1. Les outils de dépistage	5
2. L'examen clinique	7
3. Place des examens complémentaires	7
<b>II. Physiopathologie des douleurs neuropathiques</b>	<b>10</b>
A. Mécanismes périphériques	10
1. Sensibilisation périphérique	10
2. Activités ectopiques	11
3. Rôle des cellules immunitaires et des cellules gliales	13
B. Mécanismes centraux	14
1. Sensibilisation centrale	14
2. Plasticité fonctionnelle et structurelle du système nerveux central	15
3. Perte du contrôle inhibiteur	16
4. Rôle des cellules immunitaires et des cellules gliales	17

<b>III. Traitement médicamenteux des douleurs neuropathiques</b>	18
A. Les antidépresseurs	21
B. Les antiépileptiques	23
1. Gabapentinoïdes	23
2. Carbamazépine	24
<b>Objectifs du doctorat</b>	26
<b>Résultats</b>	27
<b>I. Modèles animaux de douleurs neuropathiques</b>	
<b>par lésions traumatiques périphériques</b>	27
A. Introduction	27
1. Section complète du nerf sciatique	28
2. Avulsion plexique	29
3. Section de branches terminales du nerf sciatique	29
4. Ligature du nerf spinal	30
5. Ligature partielle du nerf sciatique	30
6. Ligature lâche chronique du nerf sciatique	31
7. Enserrement du nerf sciatique par un manchon	31
B. The Sciatic Nerve Cuffing Model of Neuropathic Pain in Mice	34
1. Introduction	35
2. Protocol text	35
3. Representative results	39
4. Discussion	40



<b>II. Douleurs chroniques et analgésie préventive</b>	48
A. Introduction	48
B. Traitements précoces et tardifs de l'allodynie neuropathique :	
analgésie préventive des antiépileptiques gabapentine et carbamazépine	52
1. Introduction	52
2. Méthodes	53
3. Résultats	54
4. Discussion	60
<b>III. Douleurs neuropathiques du diabète</b>	66
A. Introduction	66
1. Aspects cliniques	66
2. Aspects physiopathologiques	67
3. Modèles d'études	68
B. The antiallodynic action of nortriptyline and terbutaline is mediated by $\beta_2$ adrenoceptors and $\delta$ opioid receptors in the <i>ob/ob</i> model of diabetic polyneuropathy	70
1. Introduction	71
2. Results	71
3. Discussion	72
4. Experimental procedures	75
<b>IV. Epidémiologie des douleurs neuropathiques post-chirurgicales</b>	79
A. Introduction	79

B. Effects of $\beta_2$ agonists on post-thoracotomy pain incidence	84
1. Introduction	85
2. Methods	86
3. Results	88
4. Discussion	90
<b>Discussion générale</b>	100
A. Limites méthodologiques des travaux précliniques	101
1. Limites des tests nociceptifs	102
2. Limites du modèle de douleur neuropathique	103
B. Prévention des douleurs neuropathiques post-chirurgicales	104
1. En période pré-opératoire	104
2. En période peropératoire	105
3. En période post-opératoire	106
C. Impact d'un traitement par antiépileptiques sur la douleur neuropathique :	
aspects précliniques	107
1. Gabapentine et canaux calcium	107
2. Carbamazépine et canaux sodium	107
3. Gabapentine, carbamazépine et activation gliale	108
D. Travaux en cours : Bêtapain	110
1. Les objectifs et critères d'évaluation	110
2. Plan expérimental	111
3. Déroulement pratique de l'essai	111
4. Etat d'avancement de l'essai	112
<b>Conclusion et perspectives</b>	113
<b>Bibliographie</b>	114

# INTRODUCTION

---

## **Introduction : de la douleur à la douleur neuropathique**

---

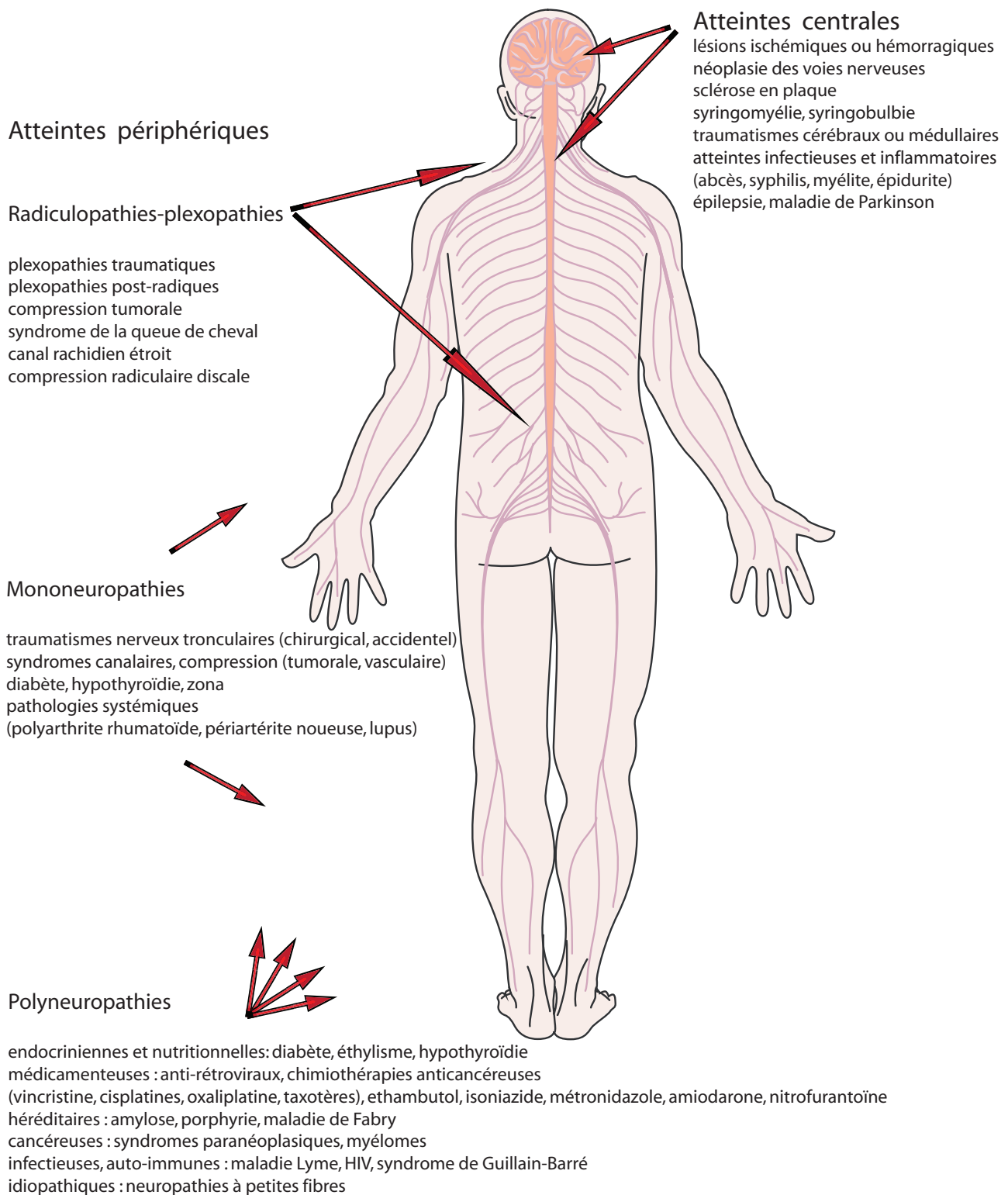
La douleur est définie par l'International Association for the Study of Pain (IASP) comme « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite en des termes évoquant une telle lésion ». Constituant un signal d'alarme, la douleur aiguë entraîne des réactions dont la finalité est la préservation de l'intégrité de l'organisme. Lorsque la douleur persiste au-delà d'une période de plusieurs mois, elle est considérée comme chronique. Cette distinction ne tient compte que de la durée et pas des mécanismes sous-jacents. Pourtant, à l'inverse de la douleur aiguë, la douleur chronique est considérée comme une maladie en soi, accompagnée d'une altération de la personnalité de l'individu, ainsi que de sa vie familiale, sociale et professionnelle (Huang et al., 2006). La compréhension des processus de chronicisation des douleurs passe par la connaissance des mécanismes qui permettent le passage de l'aigu au chronique. En pratique clinique, il apparaît évident que de nombreux syndromes douloureux chroniques répondent à une même définition et semblent pourtant sustentés par des mécanismes de chronicisation différents. De façon didactique, les syndromes douloureux sont également distingués en fonction de leur mécanisme physiopathologique : il est ainsi décrit des douleurs nociceptives et des douleurs neuropathiques. L'IASP définit les douleurs nociceptives comme « des douleurs provoquées par l'activation des nocicepteurs », avec les douleurs inflammatoires comme archétype. Ces douleurs sont entraînées, lors de phénomènes inflammatoires ou de lésions tissulaires, par la libération de médiateurs qui stimulent les voies nerveuses de transmission et d'intégration de la douleur. Par contraste, la définition d'une douleur neuropathique est la suivante : « douleur secondaire à une lésion ou une maladie affectant le système somatosensoriel » (Tiede et al., 2008). Ces douleurs sont ainsi le reflet de phénomènes pathologiques du système nerveux lui-même, que ce soit au niveau périphérique (les nerfs, les plexus, les racines ou les ganglions sensitifs) ou centrale (la moelle épinière ou le cerveau). Les douleurs neuropathiques peuvent donc être induites par un grand nombre de situations pathologiques différentes qui ont toutes en commun d'altérer le fonctionnement physiologique du système nerveux. Ce type de douleur est au cœur de notre travail de thèse et la suite de notre présentation se limitera à ce sujet.

Nous allons présenter dans cette introduction une première partie clinique où seront décrits les étiologies, la sémiologie et les critères diagnostiques des douleurs neuropathiques. Puis, dans une seconde partie, nous évoquerons les principaux mécanismes physiopathologies des douleurs neuropathiques. Enfin, dans une dernière partie plus thérapeutique, seront abordés les antidépresseurs et les antiépileptiques recommandés dans le traitement de ces douleurs.

## **I. Aspects cliniques des douleurs neuropathiques**

### **A. Etiologies**

L'atteinte des voies somatosensorielles conditionne l'apparition des douleurs neuropathiques. Ces voies somatosensorielles comprennent toutes les structures qui permettent la perception consciente d'informations sensorielles provenant de la peau et de l'appareil musculo-squelettique. Ces informations concernent aussi bien la perception de stimuli mécaniques, que thermiques ou chimiques. Les afférences vont rejoindre la corne dorsale de la moelle épinière par la racine postérieure des nerfs rachidiens. A ce niveau, les afférences vont transmettre l'information, via des neurones de second ordre, à l'étage supra-spinal par des voies ascendantes. Ces voies projettent sur des noyaux thalamiques qui relaient ensuite l'information vers d'autres aires cérébrales. A l'inverse, des faisceaux descendants issus d'aires corticales et sous corticales vont moduler, en inhibant ou en facilitant, l'activité des réseaux de la corne dorsale de la moelle (von Hehn et al., 2012). Une lésion ou une maladie de ces structures et/ou circuits est donc susceptible d'entraîner l'apparition de douleurs neuropathiques. Cette diversité de topographie d'atteintes et de lésions (mécaniques, infectieuses, toxiques par exemple) rend compte de la complexité des douleurs neuropathiques dans leur expression clinique. La démarche diagnostique s'appuie à la fois sur la sémiologie évocatrice mais également sur le contexte étiologique. Il convient de rechercher la pathologie responsable de l'atteinte du système nerveux. Il est habituel de distinguer les atteintes du système nerveux central, majoritairement des pathologies neurologiques à proprement parler, des atteintes du système nerveux périphérique qui peuvent être de causes très variées (Baron et al., 2010). Nous proposons une liste non exhaustive en **figure d'Introduction-1 (figure I-1)**.



**Figure I-1. Etiologies des douleurs neuropathiques**

## **B. Sémiologie**

La sémiologie des douleurs neuropathiques se caractérise par l'association de douleurs et de sensations anormales à un déficit neurologique dans un territoire nerveux systématisé (Bouhassira et al., 2005; Bennett et al., 2007). Les symptômes douloureux neuropathiques peuvent survenir après un délai variable de quelques mois à quelques années après la lésion nerveuse initiale, en particulier dans le cas d'accidents vasculaires cérébraux (Andersen et al., 1995). Ces symptômes, dont aucun pris isolément n'est pathognomonique, sont associés à des degrés divers et constituent le cœur de la sémiologie neuropathique (Atta et al., 2008).

### **1. Douleurs et sensations anormales**

#### ***a) Douleurs spontanées paroxystiques et/ou permanentes***

Les douleurs spontanées paroxystiques surviennent en général par séries, répétées plusieurs fois par jour et sont décrites comme des douleurs fulgurantes, en décharges électriques ou en coups de poignard. Les douleurs spontanées permanentes représentent un fond douloureux à type d'étau, de compression ou de brûlures.

#### ***b) Douleurs évoquées***

**l'allodynie** est définie par une sensation douloureuse déclenchée par une stimulation normalement non douloureuse. Il est distingué différents types d'allodynie selon la nature du stimulus : alldynie thermique au chaud ou au froid, alldynie mécanique dynamique (douleur provoquée par le frottement) ou mécanique statique (douleur provoquée par une pression légère). **L'hyperalgésie** correspond à une augmentation anormale de la douleur perçue en réponse à un stimulus douloureux qui en lui-même ne devrait pas provoquer une douleur d'une telle intensité. **L'hyperpathie** est définie par une douleur explosive apparaissant après la répétition d'un stimulus non douloureux.

#### ***c) Sensations anormales***

**Paresthésies et dysesthésies** sont des sensations anormales qui peuvent survenir spontanément ou être provoquées par différents stimuli et sont le plus souvent ressenties comme des picotements ou des fourmillements. La différence

réside dans le caractère pénible et désagréable des dysesthésies. Les sensations de peau cartonnée ou d'engourdissement entrent dans ces catégories de symptômes.

## **2. Déficit sensitif**

Dans le territoire des douleurs et des sensations anormales, un déficit sensitif peut être mis en évidence à l'examen. Souvent partiel, ce déficit porte le plus souvent sur les sensibilités thermiques et nociceptives évoquées, mais peut également concerner la sensibilité tactile fine. Cette hypoesthésie peut être minime et à peine décelable à l'examen clinique alors que dans d'autres cas on observe jusqu'à une anesthésie complète du territoire nerveux.

## **C. Diagnostic**

### **1. Les outils de dépistage**

Si la base du diagnostic de douleurs neuropathiques repose sur l'association de signes déficitaires et douloureux dans une même aire neurologique, il s'appuie également sur le contexte de survenue de ces douleurs. Dans une situation de pathologie neurologique connue, le diagnostic est aisé par opposition à un contexte clinique non neurologique, où le risque est alors de méconnaître la composante neuropathique des douleurs présentées par un patient. Des outils de dépistage diagnostique des douleurs neuropathiques ont été élaborés (Bennett, 2001; Krause and Backonja, 2003; Bouhassira et al., 2005). Ces questionnaires ont en commun des items spécifiques qui permettent d'orienter vers le diagnostic de douleurs neuropathiques. En France, c'est le questionnaire **DN4** (Bouhassira et al., 2005) (**figure I-2**) qui est l'outil recommandé par la Haute Autorité de Santé (HAS). Ce questionnaire présente l'avantage d'être simple d'utilisation et d'orienter le diagnostic avec une sensibilité de 82,9% et une spécificité de 89,9%. Ces propriétés rendent le DN4 également intéressant comme outil de recherche clinique, dans l'évaluation de la prévalence des douleurs neuropathiques dans une population donnée.





**DN4**

## QUESTIONNAIRE DN4

Nom : .....

Prénom : .....

Date : .....

Pour estimer la probabilité d'une douleur neuropathique, veuillez répondre à chaque item des 4 questions ci-dessous par «oui» ou «non»

### INTERROGATOIRE DU PATIENT

QUESTION 1 : la douleur présente-t-elle une ou plusieurs des caractéristiques suivantes ?

	OUI	NON
1. Brûlure	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Sensation de froid douloureux	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Décharges électriques	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

QUESTION 2 : la douleur est-elle associée dans la même région à un ou plusieurs des symptômes suivants ?

	OUI	NON
4. Fourmillements	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Picotements	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Engourdissement	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Démangeaisons	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

### EXAMEN DU PATIENT

QUESTION 3 : la douleur est-elle localisée dans un territoire ou l'examen met en évidence ?

	OUI	NON
8. Hypoesthésie au tact	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. Hypoesthésie à la piqure	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

QUESTION 4 : la douleur est-elle provoquée ou augmentée par :

	OUI	NON
10. Le frottement	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

OUI = 1 point      NON = 0 point

**Valeur seuil pour le diagnostic  
de douleur neuropathique : 4/10**

Score du Patient :  /10

Figure I-2. Questionnaire DN4, d'après Bouhassira et al. 2005.

## **2. L'examen clinique**

L'examen clinique est indispensable pour confirmer le diagnostic de douleurs neuropathiques. La localisation et l'étendue de la zone douloureuse confirment la topographie neurologique. Dans cette zone douloureuse, l'examen recherche un déficit des différentes sensibilités : tactile, thermique au chaud ou au froid, à la piqûre, aux vibrations en la comparant à une zone saine homologue (contralaterale par exemple). L'évaluation des douleurs évoquées recherche, toujours dans la même zone et en comparatif avec une zone saine, une allodynie mécanique dynamique à l'aide d'une brosse et mécanique statique avec une épingle à bout mousse ou un filament de von Frey. L'allodynie thermique est explorée avec des tubes froids et chauds ou des rouleaux thermiques. Une sommation temporelle peut être explorée en répétant des stimulations avec une épingle à bout mousse ou un pinceau, et dévoiler ainsi une hyperpathie. L'appréciation de l'importance respective des différents symptômes douloureux peut être réalisée à l'aide du questionnaire Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI) (**figure I-3**). Il s'agit d'un auto-questionnaire élaboré pour discriminer et quantifier chacune des différentes composantes des douleurs neuropathiques et leurs variations en réponse à un traitement (Bouhassira et al., 2004).

## **3. Place des examens complémentaires**

Si le diagnostic positif des douleurs neuropathiques est exclusivement clinique, des examens complémentaires sont à l'étude et pourraient permettre d'obtenir des marqueurs des douleurs neuropathiques. On peut citer l'exemple de la biopsie cutanée qui évalue la densité intra-épidermique en fibres nerveuses (Colloagues et al., 2009; Serra et al., 2012), ou encore les potentiels évoqués laser qui permettent d'apprécier la fonctionnalité des fibres fines (Lingueglia, 2007). Pour le diagnostic étiologique, des examens complémentaires peuvent être indiqués pour confirmer la lésion ou la maladie à l'origine des douleurs neuropathiques.

Un système de gradation du diagnostic de douleurs neuropathiques, en fonction de l'authentification de la pathologie lésionnelle, a d'ailleurs été proposé par Treede et al. (Treede et al., 2008). Cette stratégie mène au diagnostic de douleur neuropathique définie, probable ou possible, selon les critères cliniques et les

résultats d'examen complémentaires. Quatre critères diagnostiques sont ainsi suggérés :

1. douleur ayant une distribution neuro-anatomique suggérant une systématisation neurologique
2. histoire clinique de lésion ou de maladie affectant le système somatosensoriel périphérique ou central
3. confirmation d'une distribution neuro-anatomique de la douleur par au moins un test paraclinique
4. confirmation de la lésion ou de la maladie neurologique en cause par au moins un test paraclinique

Une douleur neuropathique serait définie par l'association des critères 1 à 4, serait considérée comme « probable » par l'association des critères 1,2 et 3 ou 4, et considérée comme « possible » devant la seule présence des critères 1 et 2. Cette gradation n'est toutefois pas adaptée à la pratique clinique quotidienne et devrait être utilisée en cas d'incertitude diagnostique.

*Nous voudrions savoir si vous avez des douleurs spontanées, c'est-à-dire des douleurs en l'absence de toute stimulation. Pour chacune des questions suivantes, entourez le chiffre qui correspond le mieux à l'intensité de vos douleurs spontanées en moyenne au cours des 24 dernières heures. Entourez le chiffre 0 si vous n'avez pas ressenti ce type de douleur. (Veuillez n'entourer qu'un seul chiffre)*

Q1/ Votre douleur est-elle comme une brûlure ?

Aucune brûlure	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Brûlure maximale imaginable
----------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	-----------------------------

Q2/ Votre douleur est-elle comme un étai ?

Aucun étai	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Etai maximal imaginable
------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	-------------------------

Q3/ Votre douleur est-elle comme une compression ?

Aucune compression	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Compression maximale imaginable
--------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	---------------------------------

Q4/ Au cours des dernières 24 heures, vos douleurs spontanées ont été présentes:

*Veuillez cocher la réponse qui correspond le mieux à votre état*

En permanence	<input type="checkbox"/>
Entre 8 et 12 heures	<input type="checkbox"/>
Entre 4 et 7 heures	<input type="checkbox"/>
Entre 1 et 3 heures	<input type="checkbox"/>
Moins d'1 heure	<input type="checkbox"/>

*Nous voudrions savoir si vous avez des crises douloureuses brèves. Pour chacune des questions suivantes, entourez le chiffre qui correspond le mieux à l'intensité de vos crises douloureuses en moyenne au cours des 24 dernières heures. Entourez le chiffre 0 si vous n'avez pas ressenti ce type de douleur. (Veuillez n'entourer qu'un seul chiffre)*

Q5/ Avez-vous des crises douloureuses comme des décharges électriques ?

Aucune décharge électrique	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Décharge électrique maximale imaginable
----------------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	---

Q6/ Avez-vous des crises douloureuses comme des coups de couteau ?

Aucun coup de couteau	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Coup de couteau maximal imaginable
-----------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	------------------------------------

Q7/ Au cours des dernières 24 heures, combien de ces crises douloureuses avez-vous présenté ?

*Veuillez cocher la réponse qui correspond le mieux à votre état*

Plus de 20	<input type="checkbox"/>
Entre 11 et 20	<input type="checkbox"/>
Entre 6 et 10	<input type="checkbox"/>
Entre 1 et 5	<input type="checkbox"/>
Pas de crise douloureuse	<input type="checkbox"/>

*Nous voudrions savoir si vous avez des douleurs provoquées ou augmentées par le frottement, la pression, le contact d'objets froids sur la zone douloureuse. Pour chacune des questions suivantes, entourez le chiffre qui correspond le mieux à l'intensité de vos douleurs provoquées en moyenne au cours des 24 dernières heures. Entourez le chiffre 0 si vous n'avez pas ressenti ce type de douleur. (Veuillez n'entourer qu'un seul chiffre)*

Q8/ Avez-vous des douleurs provoquées ou augmentées par le frottement sur la zone douloureuse ?

Aucune douleur	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Douleur maximale imaginable
----------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	-----------------------------

Q9/ Avez-vous des douleurs provoquées ou augmentées par la pression sur la zone douloureuse ?

Aucune douleur	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Douleur maximale imaginable
----------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	-----------------------------

Q10/ Avez-vous des douleurs provoquées ou augmentées par le contact avec un objet froid sur la zone douloureuse ?

Aucune douleur	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Douleur maximale imaginable
----------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	-----------------------------

*Nous voudrions savoir si vous avez des sensations anormales dans la zone douloureuse. Pour chacune des questions suivantes, entourez le chiffre qui correspond le mieux à l'intensité de vos sensations anormales en moyenne au cours des 24 dernières heures. Entourez le chiffre 0 si vous n'avez pas ressenti ce type de sensation. (Veuillez n'entourer qu'un seul chiffre)*

Q11/ Avez-vous des picotements ?

Aucun picotement	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Picotement maximal imaginable
------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	-------------------------------

Q12/ Avez-vous des fourmillements ?

Aucun fourmillement	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Fourmillement maximal imaginable
---------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----------------------------------

**RESULTATS**

SCORE TOTAL		SOUS-SCORES	
1 -	Q1 = .....	BRULURES (Douleurs spontanées superficielles):	Q1 = ...../10
2 -	(Q2+Q3) = .....	CONSTRUCTION (Douleurs spontanées profondes):	(Q2+Q3)/2 = ...../10
3 -	(Q5+ Q6) = .....	DOULEURS PAROXYSTIQUES:	(Q5+ Q6)/2 = ...../10
4 -	(Q8+Q9+Q10) = .....	DOULEURS EVOQUEES:	(Q8+Q9+Q10)/3 = ...../10
5 -	(Q11+Q12) = .....	PARESTHESIES/DYSESTHESIES:	(Q11+Q12)/2 = ...../10
	(1+2+3+4+5) = ...../100		

Figure I-3. Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI). D'après Bouhassira et al. 2004.

## **II. Physiopathologie des douleurs neuropathiques**

Notre connaissance des mécanismes qui sous-tendent les douleurs neuropathiques provient essentiellement des études comportementales, cellulaires et moléculaires issues de la recherche fondamentale. Si ces travaux nous ont permis d'approfondir la compréhension des mécanismes physiopathologiques, ils doivent être cependant considérés avec prudence. Les modèles animaux de douleurs neuropathiques présentent des limites. La première tient au fait que la plupart des modèles de douleurs neuropathiques chez l'animal résultent de lésions périphériques et en particulier de traumatismes du nerf sciatique ou de ses branches. Une autre limite est liée à l'extrapolation de l'étude du comportement animal à l'expérience de la douleur que peut ressentir l'être humain. Ce chapitre s'appuiera essentiellement sur des données obtenues par des études précliniques. L'ensemble des résultats de ces travaux fondamentaux mettent en évidence de nombreux mécanismes impliqués dans les douleurs neuropathiques. Celles-ci apparaissent comme la conséquence d'un ensemble de réactions inadaptées en réponse à une agression du système somatosensoriel. Très schématiquement, il apparaît d'une part une activité anormale dite ectopique et une hyperexcitabilité des fibres sensorielles périphériques, et d'autre part une amplification et une pérennisation des douleurs neuropathiques par des mécanismes centraux.

### **A. Mécanismes périphériques**

#### **1. Sensibilisation périphérique**

La sensibilisation des terminaisons périphériques des fibres nociceptives est classiquement décrite dans des conditions inflammatoires, notamment après un dégât tissulaire (Julius and Basbaum, 2001). Mais elle peut également survenir en situation aiguë par une atteinte initiale d'une structure nerveuse, comme dans le cas d'un zona. Le paradigme de la lésion axonale est la dégénérescence wallérienne, qui entraîne une cascade d'évènements accompagnant la dégradation de la fibre nerveuse et de la myéline qui l'entoure (Navarro et al, 2007; Dubovy, 2011). Lors d'une lésion nerveuse, il est observé sur le site lésionnel une infiltration de cellules immunitaires, comme des polynucléaires neutrophiles ou des lymphocytes T (Moalem and Tracey, 2006). Des cytokines pro-inflammatoires comme le Tumor

Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), l'Interleukine 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), des médiateurs de l'inflammation (bradykinine, prostaglandines) et des neurotrophines comme le Nerve Growth Factor (NGF) sont libérés et vont majorer l'excitabilité des fibres nerveuses (Sommer and Kress, 2004; Thacker et al., 2007).

## 2. Activités ectopiques

Une lésion nerveuse va entraîner une activité spontanée de la fibre lésée, mais également des fibres nociceptives adjacentes et intactes (Wu et al., 2001; Amir et al., 2005), probablement par contact avec les médiateurs de l'inflammation libérés par les cellules immunitaires et les cellules de Schwann. Chez l'homme, cette activité spontanée des nocicepteurs a été enregistrée par micro-neurographie en condition neuropathique diabétique (Orstavik and Jorum, 2010) comme dans d'autres pathologies neuropathiques (Ochoa et al., 2005). S'il apparaît pertinent d'associer cette activité ectopique observée à la genèse des symptômes douloureux spontanés, le lien de causalité reste à mettre en évidence (Orstavik et al., 2006).

Les propriétés d'excitabilité de la membrane neuronale sont liées aux canaux ioniques, ce qui fait de ces derniers des acteurs directs de l'activité anormale des fibres sensorielles. Parmi ces canaux ioniques, les canaux sodium voltage-dépendants ont été largement étudiés dans les phénomènes douloureux (Cummins et al., 2007). Les canaux sodium voltage-dépendants (Nav) sont des pores ioniques sélectifs aux ions sodium, dont l'ouverture est contrôlée par le potentiel transmembranaire. Ces canaux exercent un rôle primordial dans le contrôle de l'excitabilité des cellules nerveuses et sont, en particulier, responsables de la phase dépolarisante du potentiel d'action et de la propagation des signaux électriques le long des fibres (Catterall, 2000). Sur les 9 isoformes identifiées, 3 sous-types (Nav1.7, 1.8 et 1.9) sont sélectivement exprimés dans le système nerveux périphérique et en particulier dans les afférences nociceptives. Le sous-type 1.3 est très peu exprimé en condition physiologique chez l'adulte. Dans les modèles de douleurs neuropathiques, ces canaux sont exprimés et répartis de façon différente et leur fonctionnement modifié (Tàl et al., 1999). Leur participation dans la symptomatologie douloureuse neuropathique a d'abord été suggérée par l'effet antalgique sur les

douleurs neuropathiques de la lidocaïne ou de la mexilétine qui ont comme principale propriété de bloquer ces canaux sodium (Gracely et al., 1992; Devor, 2006) et par-là ont un effet stabilisateur de membrane. Le canal Nav1.7 a montré son rôle crucial dans la perception douloureuse. En effet, des syndromes douloureux chroniques comme l'érythémalgie (Han et al., 2006) ou le syndrome de douleur extrême paroxystique (Fertleman et al., 2006) sont liés à une mutation de type « gain de fonction » du gène *SCN9A* codant Nav1.7 (Fischer and Waxman, 2010). Des enregistrements microneurographiques réalisés chez ces patients montrent une activité ectopique directement liée à cette anomalie canalaire. À l'inverse, une mutation entraînant une « perte de fonction » de ce canal Nav1.7 est à l'origine d'un syndrome d'insensibilité congénitale à la douleur (Cox et al., 2006). De même, une mutation du gène codant le canal Nav1.8, principalement exprimé par les fibres nociceptives, pourrait être à l'origine d'une neuropathie à petites fibres chez l'homme (Huang et al., 2013) et le rôle de ce canal dans l'allodynie au froid a été observé (Zimmermann et al., 2007). Le rôle de Nav1.9 est largement décrit dans les modèles de douleur inflammatoires et beaucoup moins dans les douleurs neuropathiques. Une diminution de son expression semble être corrélée avec une diminution du comportement douloureux dans un modèle de ligature de la racine L5 (Theile and Cummins, 2011). Enfin, le canal Nav1.3, uniquement exprimé en phase de développement embryonnaire, se retrouve surexprimé après une lésion nerveuse chez l'animal (Black et al., 1999). Toutefois, les modalités de l'implication de ces canaux sodium Nav dans le comportement douloureux de modèles neuropathiques animaux restent discutées, les résultats de différentes études étant contradictoires (Berta et al., 2008; Dib-Hajj et al., 2010; Chattopadhyay et al., 2011).

Les canaux potassium voltage-dépendants sont également requis dans la génération spontanée de potentiels d'action induite par une lésion nerveuse. Ces canaux, qui ont pour propriétés de stabiliser la membrane des neurones, sont sous-exprimés après lésion nerveuse. Inversement, leur ouverture est provoquée par la rétigabine, un anti-épileptique qui diminue la symptomatologie neuropathique chez l'animal mais pas chez l'homme (Kim et al., 2002; Blackburn-Munro and Jensen, 2003; Rose et al., 2011). D'autres types de canaux potassium, comme les canaux de type TWIK-relatés  $K^+$  (TREK) et en particulier TRESK et TREK-2 (Dobler et al., 2007), jouent un rôle essentiel dans le maintien du potentiel membranaire et sont fortement exprimés par les neurones sensoriels. Ces canaux vont diminuer de 30 à 40% après une lésion

nerveuse et entraîne une dépolarisation soutenue de ces neurones (Tulleuda et al., 2011).

Les canaux calcium voltage-dépendants sont également des structures déterminantes dans l'activité neuronale. Leur activation en réponse à une dépolarisation membranaire entraîne une entrée de calcium dans la cellule et l'activation de mécanismes dépendants du calcium comme l'activation d'enzymes, la libération de neurotransmetteurs ou l'expression génique. Ces canaux, surexprimés par les afférences sensorielles lors d'une lésion nerveuse, sont une cible pour de nombreux médicaments recommandés dans les douleurs neuropathiques. Nous ne ferons que citer l'exemple des gabapentinoïdes, que nous décrirons plus en détail dans le chapitre suivant, et qui agissent sur une sous-unité de ces canaux, modifiant potentiellement la libération des neurotransmetteurs et la synaptogenèse au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (Dolphin, 2012).

### **3. Rôle des cellules immunitaires et des cellules gliales**

Lors d'une lésion nerveuse, les cellules du système immunitaire vont être sollicitées et intervenir à différents niveaux du système somatosensoriel. Au niveau cutané, on peut observer une activation des cellules de Langerhans, cellules dendritiques présentatrices d'antigènes, dans des neuropathies post-chimiothérapeutiques (Siau et al., 2006). Sur le site lésionnel comme sur l'extrémité distale du nerf lésé, il est observé une infiltration de cellules immunitaires comme des macrophages, des leucocytes neutrophiles ou des lymphocytes T (Scholz and Woolf, 2007; Dubovy, 2011; Kim and Moalem-Taylor, 2011). Au niveau des nerfs périphériques, les cellules de Schwann participent au phénomène de sensibilisation en libérant de l'Adénosine Triphosphate (ATP), des cytokines pro-inflammatoires, des chémokines, des prostaglandines et du NGF (Scholz and Woolf, 2007). Les cellules immunitaires (macrophages, leucocytes et lymphocytes) vont également infiltrer les ganglions rachidiens et en condition neuropathique, les cellules satellites qui y résident vont proliférer (Hu et al., 2007).



## **B. Mécanismes centraux**

### **1. Sensibilisation centrale**

Certains symptômes douloureux provoqués, comme l'hyperalgésie ou l'allodynie mécanique dynamique, suggèrent une implication du système nerveux central, en particulier une sensibilisation des neurones nociceptifs centraux (Woolf and Mannion, 1999; Woolf and Salter, 2000; Kuner, 2010). Définie par une augmentation de l'excitabilité des neurones des voies nociceptives au sein du système nerveux central, elle entraîne une amplification des réponses aux stimuli nociceptifs, des réponses douloureuses à des stimuli non-nociceptifs et une extension de la perception douloureuse au-delà de la zone lésée (Woolf, 2011). Ce phénomène de sensibilisation centrale implique des modifications fonctionnelles au niveau des connexions de la corne dorsale de la moelle et en particulier une augmentation de l'excitabilité post-synaptique (Latre mo liere and Woolf, 2009). Cette plasticité synaptique est induite par la sensibilisation périphérique et l'activité ectopique des nocicepteurs consécutive à la lésion nerveuse. Cette potentialisation semble être initiée par l'hyperactivité des fibres fines de type C (Koltzenburg et al., 1994). Les principaux acteurs décrits dans cette potentialisation synaptique dans la corne dorsale sont les récepteurs des acides aminés excitateurs libérés par les afférences primaires, mais également les récepteurs de la substance P et ceux du Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) (Latre mo liere and Woolf, 2009). Un rôle particulièrement important est tenu par le glutamate, principal neurotransmetteur excitateur libéré par les nocicepteurs activés. Il existe 3 types de récepteurs du glutamate qui se distinguent en 2 catégories: les récepteurs de type canaux ioniques qui porte le nom de leur agoniste, AMPA/kainate d'une part et N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) d'autre part, et les récepteurs métabotropiques liés à une protéine G (mGluR). La transmission d'un message nociceptif est médiée, en condition physiologique, par l'activation des récepteurs post-synaptiques de type AMPA. Les récepteurs post-synaptiques NMDA restent bloqués par la présence d'ions magnésium qui ferment ces canaux. Ce bloc est levé en cas d'une activation soutenue des fibres C (D'Mello and Dickenson, 2008). L'augmentation de la libération de glutamate, de CGRP et de substance P vont désinhiber les récepteurs NMDA et entraîner des cascades d'évènements intracellulaires post-synaptiques (Khasabov et

al., 2002). Parmi les 3 classes de récepteurs métabotropiques au glutamate, les effets sont distincts : le groupe I (mGluR1) a pour propriété de majorer la transmission synaptique en activant les phospholipases C, alors que l'activation des groupes II et III (mGluR2 et mGluR3) réduit la transmission synaptique des messages nociceptifs en inhibant l'adénylate-cyclase (Pan et al., 2008). La conséquence globale de l'activation de ces récepteurs est une augmentation du calcium intracellulaire post-synaptique, ce qui entraîne une réaction en chaîne au niveau de nombreux second messagers, comme des protéines kinases (Woolf and Salter, 2000; D'Mello and Dickenson, 2008; Matsumura et al., 2010; Katano et al., 2011; Miletic et al., 2011). L'ensemble de ces réactions va entraîner des modifications à long-terme des propriétés fonctionnelles des neurones nociceptifs dans le sens d'une hyperexcitabilité.

Dans le cadre d'une lésion nerveuse, des fibres sensorielles non-nociceptives de gros diamètre (fibres A $\beta$ ) peuvent subir des modifications phénotypiques qui les mènent à exprimer des neuropeptides leur conférant la capacité de déclencher ou d'entretenir ces phénomènes de sensibilisation centrale (Nitzan-Luques et al., 2011). Enfin, il est démontré que l'activation de la microglie contribue à cette hyperexcitabilité neuronale par le biais de la diffusion de cytokines modifiant les propriétés pré- et post-synaptiques (DeLeo and Yeziarski, 2001). Les astrocytes spinaux interviennent également dans le maintien d'une douleur neuropathique (Kawasaki et al., 2008).

## **2. Plasticité fonctionnelle et structurelle du système nerveux central**

La plasticité neuronale, définie par la capacité des neurones à se modifier en fonction de l'environnement, est un élément clef de la chronicisation des douleurs (Woolf and Salter, 2000). Cette plasticité peut s'exprimer sous différentes formes et à différents niveaux des voies nociceptives centrales. Ainsi, le renforcement de la transmission synaptique obtenu par les phénomènes de potentialisation à long-terme « Long-Term Potentiation » (LTP) se retrouve aussi bien dans la corne dorsale de la moelle épinière (Ikeda et al., 2003) qu'au niveau cortical (Toyoda et al., 2009; Li et al., 2010). En conséquent, cette plasticité entraîne une augmentation des réponses à un stimulus sensoriel donné, une augmentation du niveau d'activité

spontanée, du temps d'activité en réponse à un stimulus nociceptif ou de l'extension topographique de la zone douloureuse (Woolf and Salter, 2000; Schoffnegger et al., 2008).

Après une lésion nerveuse périphérique, une augmentation du nombre des épines dendritiques a été observée dans la corne dorsale de la moelle, associée à des manifestations comportementales d'hyperalgésie (Tan et al., 2011). Au niveau structurel, la plasticité est également responsable de modifications de la densité des synapses et de phénomènes de dégénérescence et de régénération au niveau neuronal. Une hypothèse évoquée est que l'ensemble de ces phénomènes peut conduire au niveau médullaire à une réorganisation des connexions des afférences primaires (Woolf et al., 1992). Plus récemment, il a été démontré que des variations de densité de la substance grise cérébrale peuvent survenir dans différentes pathologies douloureuses chroniques (Baliki et al., 2011), laissant entrevoir la possibilité d'identifier des modifications phénotypiques douloureuses grâce à l'imagerie cérébrale (Tracey, 2011).

### **3. Perte du contrôle inhibiteur**

La modulation des messages nociceptifs, d'origine médullaire ou supra-spinale par les contrôles descendants, est probablement altérée dans les phénomènes neuropathiques douloureux. L'inhibition exercée par les interneurons qui produisent de l'Acide Gamma Amino Butyrique (GABA) et de la glycine sur le message nociceptif est diminuée par une lésion nerveuse périphérique partielle (Moore et al., 2002). Au niveau médullaire, une perte de neurones inhibiteurs GABAergiques est observée après une lésion nerveuse périphérique, mais ne semble pas suffisante pour le développement de l'hyperalgésie thermique (Polgar et al., 2003; Scholz et al., 2005). De plus, une diminution des courants post-synaptiques inhibiteurs induits par le GABA dans la corne dorsale peut être constatée lors d'une neuropathie périphérique (Janssen et al., 2011). Cette perte de l'inhibition GABAergique du message nociceptif peut être la conséquence de plusieurs phénomènes. Une hypothèse serait la perte des interneurons GABAergiques par une apoptose consécutive à une stimulation excitotoxique (Scholz et al., 2005). Il a également été suggéré que le TNF- $\alpha$  libéré dans la corne dorsale est à l'origine de la

réduction d'activité des interneurons GABAergiques (Zhang et al., 2010). Enfin, une dernière hypothèse propose une diminution de l'effet inhibiteur du GABA par perte de l'activité du co-transporteur potassium/chlore (KCC2), à la membrane postsynaptique. En modifiant le gradient des ions chlore, l'ouverture des pores membranaires provoquée par le GABA ou la glycine ne permet plus une entrée suffisante d'ions chlorures pour entraîner une inhibition neuronale et peut même déboucher sur un effet excitateur (Coull et al., 2003). Cette perte d'activité des KCC2 pourrait être liée à la libération de BDNF par la microglie lors de son activation en situation de pathologies neuropathiques (Coull et al., 2005; Jolival et al., 2008; Lu et al., 2008).

Cette perte d'inhibition locale dans la corne dorsale peut s'accompagner d'une altération des contrôles descendants qui transitent par des voies issues du tronc cérébral, plus précisément des régions ventrale et rostro-médiane du bulbe. Des modifications dans le sens d'une perte du contrôle inhibiteur et d'une augmentation de la facilitation de la transmission nociceptive sont décrites dans différentes pathologies neuropathiques (Bea and Dickenson, 2008; Zhang et al., 2009).

#### **4. Rôle des cellules immunitaires et des cellules gliales**

Du côté homolatéral à la lésion nerveuse, la corne dorsale de la moelle épinière montre une activation de la microglie, ensemble de cellules équivalentes à des macrophages du système nerveux central (Tsuda et al., 2005; Beggs and Salter, 2010). Une fois activées, ces cellules vont présenter des modifications structurelles et fonctionnelles (Calvo and Bennett, 2012). De même, une lésion nerveuse va activer un autre type de cellules gliales que sont les astrocytes et qui vont participer au maintien des douleurs neuropathiques (Colburn et al., 1999).

La contribution des cellules du système immunitaires et des cellules gliales dans le développement et la persistance des douleurs neuropathiques en font des cibles thérapeutiques potentielles. Plusieurs études réalisées sur des modèles animaux ont déjà montré un effet significatif sur la symptomatologie neuropathique de molécules n'ayant aucun effet antalgique propre, comme des immunosuppresseurs (Marchand et al., 2009; Orhan et al., 2010) ou des inhibiteurs de

l'activation microgliale, comme la minocycline par exemple (Padi and Kulkarni, 2008; Pabreja et al., 2011).

### **III. Traitements médicamenteux des douleurs neuropathiques**

En pratique clinique, identifier la composante neuropathique des douleurs présentées par un patient permet d'orienter la prise en charge thérapeutique. Si les douleurs neuropathiques et les douleurs nociceptives peuvent se manifester par des symptômes communs ou coexister dans le cadre des douleurs mixtes, leurs traitements présentent des différences : 1/ les douleurs neuropathiques sont peu ou pas soulagées par les antalgiques utilisés dans le traitement des douleurs par excès de nociception, comme le paracétamol ou les salicylés ; 2/ contrairement aux douleurs par excès de nociception, le choix thérapeutique ne va pas être orienté par l'intensité des douleurs neuropathiques car les médicaments utilisés ne sont pas distingués par paliers en fonction de leur puissance antalgique ou de leurs caractéristiques pharmacologiques ; 3/ dans le traitement des douleurs neuropathiques, le choix de la molécule est dicté par les recommandations de sociétés savantes dans le domaine de la douleur et de la neurologie (Attal et al., 2006; Dworkin et al., 2007; Attal et al., 2010). Ces recommandations sont basées sur le niveau de preuve de l'efficacité d'un type de traitement, constaté dans des études cliniques. Ce niveau de preuve va dépendre de la puissance et de la méthodologie des essais cliniques. Les traitements recommandés en première intention sont ceux qui ont fait l'objet d'études randomisées, contrôlées et réalisées en double aveugle sur un grand nombre de patients, avec un effet bénéfique significatif et des effets secondaires considérés comme acceptables. La plupart de ces études portent sur la polyneuropathie du diabète et les douleurs post-zostériennes (Attal et al., 2006). Les traitements de première intention sont issus de 2 classes pharmacologiques : les antidépresseurs et les antiépileptiques. Parmi les antidépresseurs recommandés figurent les tricycliques et les Inhibiteurs de la Recapture de la Sérotonine et de la Noradrénaline (IRSNA). Pour les antiépileptiques, la gabapentine et la prégabaline (les gabapentinoïdes), sont recommandées dans le traitement des douleurs neuropathiques centrales et périphériques et la carbamazépine dans le traitement des douleurs névralgiques crâniennes (trigéminale et glossopharyngienne).

La liste des molécules qui disposent d'une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en France dans l'indication douleurs neuropathiques figure dans le **tableau I-1**.

Les traitements par antidépresseurs ou antiépileptiques présentent des limites, puisque seuls 30 à 50% des patients sont soulagés au prix d'effets secondaires souvent gênants, en particulier avec les antidépresseurs tricycliques, effets qui peuvent mener à l'interruption du traitement dans un certain nombre de cas (Mc Quay et al., 1996; Wiffen et al., 2005; Saarto and Wiffen, 2010). Pour un patient donné, le choix de la thérapeutique utilisée doit donc se faire sur la base de la pathologie à l'origine des symptômes neuropathiques mais aussi de la comorbidité, des interactions médicamenteuses, des contre-indications et des risques d'effets secondaires présentés par le patient.

Nous décrivons brièvement les antidépresseurs et antiépileptiques recommandés en première ligne de traitement des douleurs neuropathiques, sur lesquels repose notre travail de thèse.

Déno min a tio n Co mm une In te ma tio na le (DCI)	Mé di ca ment prin ce ps	Auto ri sa tio n de Mi se sur le Ma rc hé (AMM)
<b>Anti dé pre sse urs tri cy c li que s</b>		
A mi tri p ty line	La ro xy l®	Do u le urs ne u ro pa th i que s p é ri p hé ri que s
Im ip ra mi ne	Tro fa nil®	Do u le urs ne u ro pa th i que s et a lg ie s re b e lle s
C lo mi p ra mi ne	An a fra nil®	Do u le urs ne u ro pa th i que s
<b>Anti dé pre sse urs IRSNA</b>		
Du lo xé ti ne	C ym b a lta ®	Do u le urs ne u ro pa th i que s p é ri p hé ri que s dia bé ti que s
<b>Anti é pi le p ti que s</b>		
G a b a p e n t i n e	N e u ro n t i n ®	Do u le urs ne u ro pa th i que s p é ri p hé ri que s
Pré g a b a l i n e	L y r i c a ®	Do u le urs ne u ro pa th i que s p é ri p hé ri que s et c e n t r a l e s
C a r b a m a z é p i n e	T ě g r é t o l ®	Do u le urs ne u ro pa th i que s et né v r a l g i e s d u t r i j u m e a u et d u g l o s s o p h a r y n g i e n
Ph é n y t o ï n e	D i - H y d a n ®	N é v r a l g i e d u t r i j u m e a u
<b>Tra ite m e n t s t o p i que s</b>		
Em pl â t r e d e L i d o c a ï n e 5%	V e r s a t i s ®	Do u le urs ne u ro pa th i que s p o s t - z o s t é r i e n n e s
P a t c h d e c a p s a ï c i n e 8%	Q u t e n z a ®	Do u le urs ne u ro pa th i que s p é ri p hé ri que s n o n dia bé ti que s

**Tableau I-1.** Traitements pharmacologiques des douleurs neuropathiques en France et libellé d'AMM.

## A. Les antidépresseurs

L'effet des antidépresseurs tricycliques sur les douleurs neuropathiques a été rapidement découvert de façon empirique après l'introduction de l'imipramine dans le traitement de la dépression. Dans les années 80 apparaissent les premières études cliniques de l'amitriptyline sur les douleurs post-zostériennes (Watson et al., 1982) puis sur celles liées au diabète (Max et al., 1987). Depuis, de nombreuses études ont montré l'intérêt des antidépresseurs tricycliques puis des IRSNA dans le traitement des douleurs neuropathiques, indépendamment de la présence d'un syndrome dépressif (Sindrup et al., 2005; Attala et al., 2010; Finnerup et al., 2010). Par contre, tout comme dans le traitement de la dépression, l'effet des antidépresseurs sur les douleurs neuropathiques nécessite une administration prolongée quoique plus courte que dans le traitement de la dépression pour voir apparaître un effet antalgique. Ce délai d'action laisse supposer que le mécanisme d'action des antidépresseurs, sur la dépression comme sur la douleur, passe par des modifications moléculaires et cellulaires (Duman, 2002; Nestler et al., 2002; Sindrup et al., 2005). Un des principaux mécanismes d'action des antidépresseurs sur les douleurs neuropathiques est l'inhibition de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline. Cette modalité d'action est confirmée par le fait que les antidépresseurs, qui n'agissent pas sur le blocage de la recapture de ces monoamines, n'ont aucun effet sur les douleurs neuropathiques. D'autre part, les inhibiteurs spécifiques de la recapture de la sérotonine n'ont que peu ou pas d'impact sur les douleurs neuropathiques alors que IRSNA ont un profil antalgique significatif et similaire aux tricycliques (Sindrup et al., 2005). Le fait que des antidépresseurs inhibant sélectivement la recapture de la noradrénaline soit également efficaces sur les douleurs neuropathiques en préclinique suggère un rôle majeur de ce mode d'action dans l'effet antalgique des antidépresseurs. Les travaux menés par notre équipe dans un modèle murin ont permis de démontrer que la noradrénaline recrutée par les antidépresseurs agit spécifiquement via les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques pour exercer son effet antalgique sur l'allodynie neuropathique (Yalcin et al., 2009b; Yalcin et al., 2009a). Il a ensuite été montré que la seule stimulation des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques par des agonistes était suffisante pour soulager cette allodynie. En effet, différents  $\beta_2$ -agonistes (salbutamol, terbutaline par exemple) en traitement prolongé ont une efficacité thérapeutique



comparable à celle des antidépresseurs sur les douleurs neuropathiques en préclinique (Choucair-Jaafar et al., 2009; Yalcin et al., 2010). Les investigations réalisées ont de plus montré le rôle des cellules satellites du ganglion rachidien et la diminution de la production de TNF- $\alpha$  membranaire lors du traitement par antidépresseurs (Bohren et al., 2013), offrant ainsi de nouvelles pistes d'études thérapeutiques.

Toutefois, les antidépresseurs tricycliques semblent, au regard des méta-analyses (Saarto and Wiffen, 2010), plus efficaces que les autres antidépresseurs, et cela peut-être corrélié à la combinaison d'autres mécanismes que la seule inhibition de la recapture des monoamines (Sindrup et al., 2005). En effet, les tricycliques ont montré différentes propriétés susceptibles de modifier l'activité des voies nociceptives telles que l'antagonisme des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques ou des récepteurs NMDA ou encore le blocage de canaux sodium et calcium (Finnerup et al., 2007). De plus, un traitement prolongé par imipramine permet de réverser certains processus spinaux qui font suite à une lésion nerveuse périphérique et ont lieu dans la corne dorsale de la moelle épinière. Plus précisément, l'imipramine pourrait agir par inhibition des voies de signalisation intracellulaires impliquées dans le maintien des troubles sensitifs induits par une ligation du nerf sciatique (Rantamaki et al., 2007; Kusuda et al., 2013).

En clinique, si l'efficacité des antidépresseurs tricycliques sur différentes douleurs neuropathiques périphériques et centrales est bien établie, les antidépresseurs IRSNA ont surtout été étudiés dans le cadre de la polyneuropathie diabétique (Atta et al., 2010; Baron et al., 2010; Finnerup et al., 2010). Une des limites posées par les antidépresseurs est celle des effets secondaires anticholinergiques et centraux mal tolérés par les patients. Ces effets sont à l'origine des contre-indications : patients ne présentant pas de glaucome, de trouble urinaire ou de pathologie cardiovasculaire (Roose, 2000). Le profil de tolérance des IRSNA semble meilleur sur le plan cardiovasculaire, mais les effets secondaires mènent tout de même à l'interruption du traitement dans 20% des cas selon les études (Goldstein et al., 2005).

## **B. Les antiépileptiques**

Les antiépileptiques ou anticonvulsivants font partie des traitements de première intention des douleurs neuropathiques. Exception faite de la carbamazépine pour les névralgies crâniennes, gabapentine et prégabaline sont les 2 molécules recommandées. D'autres antiépileptiques font l'objet d'études dans les douleurs neuropathiques (valproate de sodium, lamotrigine, topiramate, phénytoïne, clonazépam, lacosamide), mais avec un niveau de preuve insuffisant. Ces molécules ne sont pas recommandées et ne disposent pas d'AMM dans l'indication « douleurs neuropathiques » (hormis la phénytoïne qui en France a une AMM pour les douleurs neuropathiques) et ne seront pas décrites dans ce chapitre.

### **1. Gabapentinoïdes**

La gabapentine, conçue comme un analogue du GABA, devait présenter des propriétés agonistes GABAergique. Développée par la suite, la prégabaline en est un analogue structurel. En fait, gabapentine et prégabaline ne se lient pas directement aux récepteurs GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>B</sub> et ne sont pas des précurseurs du GABA (Bialer et al., 1999; Lanneau et al., 2001). L'effet de la gabapentine comme de la prégabaline porte principalement sur les canaux calcium voltage-dépendants. Leur liaison se fait avec une sous-unité de ces canaux : la sous-unité  $\alpha 2\text{-}\delta 1$  (Marais et al., 2001; Bian et al., 2006). Or une augmentation de l'expression de cette sous-unité, aussi bien de la protéine elle-même que de son ARN messager, est observée dans le ganglion rachidien et la corne dorsale associés à une lésion nerveuse (Wang et al., 2002; Li et al., 2004). De plus, cette sous-unité des canaux calcium voltage-dépendants apparaît comme un élément clef dans l'hyperexcitabilité médullaire (Li et al., 2006a). Or l'effet des gabapentinoïdes passe par leur liaison avec cette sous-unité (Field et al., 2006; Dolphin, 2013) et une hypothèse serait que ceci bloque le transport des canaux calcium depuis leur site de synthèse vers la membrane des terminaisons pré-synaptiques (Hendrich et al., 2008; Bauer et al., 2009). Ceci aurait pour conséquence une diminution de libération de neurotransmetteurs, dont le glutamate (Cunningham et al., 2004) ou la substance P (Takasusuki and Yaksh, 2011). Une autre conséquence observée, directe ou indirecte, est la diminution de

l'activation de la microglie corrélée à l'effet anti-allodymique de la gabapentine dans un modèle murin de neuropathie diabétique (Wodarski et al., 2009).

Les gabapentinoïdes ont fait la preuve de leur efficacité dans plusieurs grandes études cliniques sur des neuropathies douloureuses chroniques, comme la polyneuropathie diabétique (Wiffen et al., 2005; Attal et al., 2010). Cependant, les gabapentinoïdes ont aussi été étudiés dans le cadre des douleurs aiguës post-opératoires et en particulier de l'analgésie multimodale (Kong and Irwin, 2007; Tiippana et al., 2007). L'usage adjuvant des gabapentinoïdes en période péri-chirurgicale permet de diminuer les scores de douleurs et l'usage post-opératoire de la morphine dans différents types d'intervention (Weinbroum, 2012), ce qui suggère un effet préventif sur l'hypersensibilisation centrale induite par la chirurgie. Le profil de tolérance de ces molécules est globalement meilleur que celui des antidépresseurs et la principale précaution tient à l'ajustement des posologies à la fonction rénale (Randinitis et al., 2003; Hindmarch et al., 2005)

## **2. Carbamazépine**

La carbamazépine a d'abord été utilisée dans le traitement de différentes formes d'épilepsie puis rapidement dans le traitement de douleurs neuropathiques après la publication d'une série de cas de névralgies du trijumeau soulagées de façon significative dans le début des années 1960 (Blom, 1962). Depuis, plusieurs études randomisées, contrôlées et en double-aveugle sont venues confirmer l'intérêt de la carbamazépine dans le traitement des névralgies trigéminales (McQuay et al., 1995; Sindrup and Jensen, 2002; Wiffen et al., 2005; Attal et al., 2006). Avec un soulagement significatif en 5 à 14 jours chez 89% des patients dans cette pathologie (McQuay et al., 1995), la carbamazépine est à ce jour le traitement de référence dans la névralgie du trijumeau (Attal et al., 2010). Son mécanisme d'action prête à cette molécule des propriétés intéressantes dans des conditions neuropathiques. En effet, la carbamazépine bloque les canaux sodium voltage-dépendants (Brau et al., 2001) avec un effet de stabilisation de membrane, mais pourrait également bloquer l'activité de canaux calcium du système nerveux central (Todorovic and Lingle, 1998; Ambrosio et al., 1999). Même si elle est probablement efficace dans le traitement d'autres douleurs neuropathiques et détient une AMM pour tout type de

douleurs neuropathiques, la carbamazépine reste essentiellement utilisée dans son indication de traitement des névralgies crâniennes. Cela peut être expliqué par le faible nombre d'études récentes réalisées dans d'autres conditions neuropathiques (Wiffen et al., 2011) et qui ne permettent pas de recommander cette molécule dans d'autres indications. Cela tient également à sa mauvaise tolérance et aux contraintes liées aux effets secondaires. En effet, le risque de neutropénie, de thrombopénie, d'agranulocytose et d'hépatite impose une surveillance biologique (héмоgramme et fonction hépatique) avant et régulièrement pendant le traitement (Askmark and Wiholm, 1990). Le risque d'effet cutané grave est rare mais accru dans certaines populations asiatiques (Hung et al., 2006) et celui d'hyponatrémie est plus élevé chez les patients âgés. Enfin, les effets secondaires les plus fréquents sont bénins (sommolence, sensations de malaise, nausées) mais suffisamment gênants pour entraîner l'interruption du traitement (Wolfe et al., 2002). Il est intéressant de noter l'existence d'un analogue structurel, l'oxcarbazépine, un antiépileptique dont l'étude dans différentes douleurs neuropathiques montre un profil d'efficacité et de tolérance globalement superposable à la carbamazépine (Pendlebury et al., 1989; Carazana and Miko shiba, 2003; Dogra et al., 2005).

# **OBJECTIFS DU DOCTORAT**

---

## Objectifs du doctorat

---

Notre travail de thèse de science s'inscrit dans la continuité des travaux antérieurs de l'équipe du Dr Michel Barrot : dans la première partie de ce travail de thèse, nous avons mené nos études sur un modèle animal de douleurs neuropathiques caractérisée chez la souris par notre équipe. La lésion du nerf sciatique par pose d'un manchon ou « cuff ». Sur ce modèle, il a été démontré dans notre laboratoire que l'effet des antidépresseurs sur l'allodynie neuropathique passe par les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques et qu'un traitement par  $\beta_2$ -agonistes supprime cette allodynie. Trois sous-chapitres constituent la première partie préclinique de ce travail de thèse.

1. La procédure de mise place d'un manchon sur le tronc du nerf sciatique de la souris a fait l'objet d'une publication dans le *Journal of Visualized Experiments* (JoVE), à laquelle nous avons participé et qui est présentée dans cette thèse.

2. Grâce à ce modèle du cuff, nous avons étudié l'impact de la période d'instauration de traitements sur l'allodynie induite chez l'animal. Pour cela, nous avons comparé l'effet de différents traitements avec un début d'administration antérieur à la lésion, à ceux administrés sur des animaux présentant une symptomatologie installée. Les différentes molécules étudiées dans ce patron d'étude sont des antidépresseurs, des antiépileptiques mais aussi la terbutaline ( $\beta_2$ -agoniste), la kétamine (antagoniste NMDA) et la dexaméthasone (corticoïde).

3. Par la suite nous avons testé l'efficacité d'un  $\beta_2$ -agoniste et d'un antidépresseur tricyclique mais dans un autre modèle de douleurs neuropathiques : la polyneuropathie diabétique, induite chez la souris obèse par déficience en leptine (souris *ob/ob*).

4. La seconde partie de notre travail de thèse est clinique. Dans une démarche translationnelle, nous avons effectué une enquête épidémiologique rétrospective pour connaître l'effet de la prise de  $\beta_2$ -agonistes au long cours sur la survenue de douleurs neuropathiques post-thoracotomie.

Dans chacune de ces parties, une introduction spécifique apporte un éclairage sur le sujet de l'étude et décrit le contexte de la question à laquelle notre travail tente de répondre.

# RÉSULTATS

---

### **Mod è les a nima ux de do ule urs ne uro pa thiq ues pa r l é sio ns tra u ma tiq ues pé ri ph é riq ues**

#### **A. Introduction**

Les do ule urs ne uro pa thiq ues so nt fré q uen tes et in va li da ntes che z l'ho mme . La co mpr é hen sio n des mé ca ni smes phy si o pa tho lo gi que qui so us-ten dent ces do ule urs ne uro pa thiq ues, et la mise au po int de tra ite men ts an ta lgi que s, ren dent né ce ssa ires les ét udes ré ali sées sur des or ga ni smes ca pa bles d'int é grer di ff é ren ts sti mu li et de ma ni fê ster les co mpo san tes é mo ti on nel les, co gn i ti ves et co mpo rte men ta les de la do ule ur. En dé pit des li mi tes pré sen tées pa r les mo d è les a nima ux, que ce so it au ni ve au é thi que (Do lgi n, 2010) ou de la pré di cti bi li té d'une tra ns la ti on des ré sulta ts à l'es p è ce hu ma i ne (Ri ce et al, 2008; Per cie du Ser tan d Ri ce, 2014), les ét udes ré ali sées che z l'a ni ma l ont pe m is une in co nte sta ble a va n c é e de la re che rre sur les do ule urs ne uro pa thiq ues et so nt a me n é es à se po ur sui vre da ns les a n n é es à ve ni r. De plus, et da ns le ca dre de la pha rma co lo gi e de sé cu ri té, la ré g le men ta ti on du dé ve lo p pe ment des mé di ca men ts ren ds ob li ga to i re l'ét ude et la ca ra c té ri sa ti on des ef fets che z l'a ni ma l d'une mo lé cu le a va nt de pou voir la tes ter en pha se I che z l'ho mme (Gu il lo n, 2010).

La re che rre pré cli ni que, en ma ti è re de do ule urs ne uro pa thiq ues, s'ap pu i e es sen ti el le men t sur des mo d è les ca ra c té ri sés che z des ro n ge urs. Ces mo d è les ont po ur ob je c ti f de re pro du i re la sy mpto ma to lo gi e ne uro pa thiq ue do ule ure use so it pa r l é sio n di re cte d'une struc tu re ner ve use, so it en in du i san t un é ta t pa tho lo gi que co nnu po ur af fe cter le sys t è me so ma to se nso ri el (Co lle o ni and Sa ce r do te, 2010; Jag gi et al, 2011; Ba rot, 2012; Gre go ry et al, 2013). D'au tres tech ni que s de l é sio ns ner ve uses pé ri ph é riq ues, vi san t à re pro du i re les pro cé du res chi ru rgi ca les tra u ma tiq ues che z l'ho mme, ont é té dé ve lo p p é es che z l'a ni ma l. Pour mi mer une do ule ur ne uro pa thiq ue post-tho ra co to mi e pa r ex em ple, un mo d è le de l é sio n ner ve use in te r co sta le uni la té ra le pa r ex po si ti on et li ga tu re des 4<sup>è me</sup> et 5<sup>è me</sup> ner fs in te r co sta ux a é té ca ra c té ri sé (Na ra et al, 2001). Ce mo d è le ap pa ra î t co mme per ti nent po ur re pro du i re les co n di ti on s ne uro pa thiq ues post-chi ru rgi ca les ma is re ste peu uti li sé. Les prin ci pa ux mo d è les de l é sio ns tra u ma tiq ues du sys t è me ner ve ux pé ri ph é ri que du ra t et de la so ur is so nt po ur la plu pa rt des l é sio ns uni la té ra les du ner f sc ia ti que. Le ni ve au de l é sio n tra u ma ti que sur le ner f sc ia ti que de ces di ff é ren ts mo d è les est sc hé ma ti sé



en **figure Résultats-1 (figure R-1)**. Ces lésions sont réalisées par une section ou une ligature à différents endroits du nerf sciatique et sont les modèles les plus couramment utilisés en recherche préclinique. Ces modèles de lésions sciatiques entraînent une hyperalgésie et une allodynie mécanique ou thermique de la patte opérée. Cette symptomatologie apparaît rapidement, dans la journée qui suit l'intervention et peut durer selon les modèles plusieurs mois avant de disparaître spontanément. Même si chez l'homme toutes les douleurs neuropathiques ne font pas suite à une lésion du nerf sciatique, il est licite de poser l'hypothèse que les mécanismes physiopathologiques soient identiques quel que soit le tronc nerveux lésé. Par contre, et cela constitue une des limites de ces modèles, une lésion nerveuse traumatique ou chirurgicale chez l'homme n'est pas systématiquement à l'origine de douleurs neuropathiques chroniques (Kehlet et al., 2006), comme c'est le cas dans ces modèles animaux (Deumens et al., 2013).

Les différents et principaux modèles de lésions nerveuses périphériques chez les rongeurs sont brièvement décrits dans cette introduction.

## **1. Section complète du nerf sciatique**

La section complète du tronc du nerf sciatique (axotomie) ou celle des racines nerveuses (rhizotomie) sont historiquement les premiers modèles animaux de douleurs neuropathiques (Lombard et al., 1979; Wall et al., 1979) et visaient à reproduire les symptômes du membre fantôme ou d'une lésion radiculaire rachidienne. Pour le modèle de l'axotomie, la section du nerf sciatique se fait entre 2 ligatures serrées sur le tronc commun, en amont de la bifurcation tibiale et péronéale du nerf sciatique. Les deux segments proximaux et distaux sont séparés pour éviter tout risque de réinnervation. Une lésion du nerf saphène y est associée, afin d'obtenir une dénerivation complète de l'extrémité distale du membre postérieur. Cette section va provoquer un névrome avec sprouting de la partie proximale et une dégénérescence wallérienne de la partie distale du nerf. Cette technique, caractérisée pour reproduire une anesthésie douloureuse de la patte opérée, est donc censée mimer le phénomène d'amputation chez l'homme. Les comportements d'automutilation présentés par les animaux ont soulevé des problèmes éthiques et fait l'objet de controverses (Riopelle, 1992). Cette réaction

d'autotomie du membre dénervé pourrait refléter la composante spontanée des douleurs sans que cela puisse être affirmé. L'inconvénient de cette lésion massive est la perte de motricité qui y est associée, et qui ne permet pas d'évaluer l'allodynie ou l'hyperalgésie associées.

## **2. Avulsion plexique**

Pour reproduire les douleurs de l'avulsion du plexus brachial, connue chez l'homme pour provoquer d'intenses paroxysmes douloureux du membre supérieur, un modèle d'avulsion plexique a été caractérisé chez le rat puis la souris. La similarité anatomique des plexus de rongeurs, issus des racines C5 à T1, avec ceux des hommes permet de telles modélisations. Ces lésions permettent d'observer l'apparition immédiate et soutenue d'un comportement douloureux avec hyperalgésie et allodynie mécanique et thermique de la patte antérieure, sans pour autant montrer de phénomène d'autotomie (Rodrigues-Filho et al., 2003; Quintao et al., 2006). Ce modèle, plus proche de la réalité clinique, permet également d'observer une bilatéralisation de l'allodynie, retrouvée sur la patte contralatérale.

## **3. Section de branches terminales du nerf sciatique : Spare d Nerve Injury (SNI)**

Le nerf sciatique se divise en trois branches principales : tibiale, péronéale et surale. Le SNI est une forme de dénervation partielle de la patte du rongeur. Dans le modèle initialement développé par Decosterd et Woolf, le nerf sciatique du rat est exposé et seules 2 de ses branches (tibiale et péronéale) sont sectionnées, la 3<sup>ème</sup> branche (surale) est préservée (Decosterd and Woolf, 2000). Dans les jours qui suivent, une hyperalgésie et une allodynie apparaissent et persistent pendant plusieurs mois. Cette durée prolongée de troubles sensitifs (6 à 7 mois) au niveau de la patte lésée est une caractéristique spécifique de ce modèle. Un des intérêts de cette technique est de pouvoir comparer la sensibilité des différents territoires neurologiques sur la même patte, d'observer l'extension des territoires douloureux et d'étudier les répercussions sur la branche nerveuse non-lésée. D'autres modèles de dénervations partielles ont par la suite été développés, en combinant la section de 2

autres des 3 branches et en préservant toujours une des 3, avec des répercussions variables sur l'intensité de l'hyperalgésie observée (Li et al., 2006b). Cette technique a également été caractérisée, avec les mêmes résultats, chez la souris (Bourquin et al., 2006).

#### **4. Ligature du nerf spinal : Spinal Nerve Ligation (SNL)**

La ligature serrée des nerfs spinaux L5 et L6, à proximité de la moelle épinière mais à distance du ganglion rachidien, est réalisée en laissant intact L4. Cette technique, contrairement au SNI, permet d'identifier et d'étudier distinctement les ganglions contenant des afférences lésées. Ce modèle de douleur lésionnelle neuropathique provoque un large panel de comportements douloureux (alldynie mécanique et au froid, hyperalgésie, douleurs spontanées) qui apparaît dans les 48 heures et perdure jusqu'à 16 semaines (Kim and Chung, 1992). Il présente l'avantage de la reproductibilité. L'inconvénient est la difficulté technique de la réalisation de cette chirurgie et son côté invasif, tout en étant proche des ganglions rachidiens avec un risque potentiel de lésion du ganglion.

#### **5. Ligature partielle du nerf sciatique : Partial Sciatic/ Nerve Ligation (PSL ou PND)**

La technique du PSL consiste à ligaturer de façon partielle (de 1/2 à 1/3 du tronc) et serrée le nerf sciatique (Seltzer et al., 1990). Il s'agit d'une technique plus invasive qu'une ligature superficielle, avec des lésions surajoutées par la pénétration d'une aiguille dans le tronc du nerf sciatique et atteinte de l'endonèvre. Entre 30 et 50 % des fibres nerveuses sont lésées par cette procédure et l'ensemble des afférences est un mélange de fibres lésées et intactes. En une semaine, apparaissent alldynies mécaniques et thermiques et hyperalgésie qui vont persister au moins 6 semaines. Ce modèle est également caractérisé chez la souris (Malmberg and Basbaum, 1998). La réalisation de cette procédure est soumise à une variabilité importante.

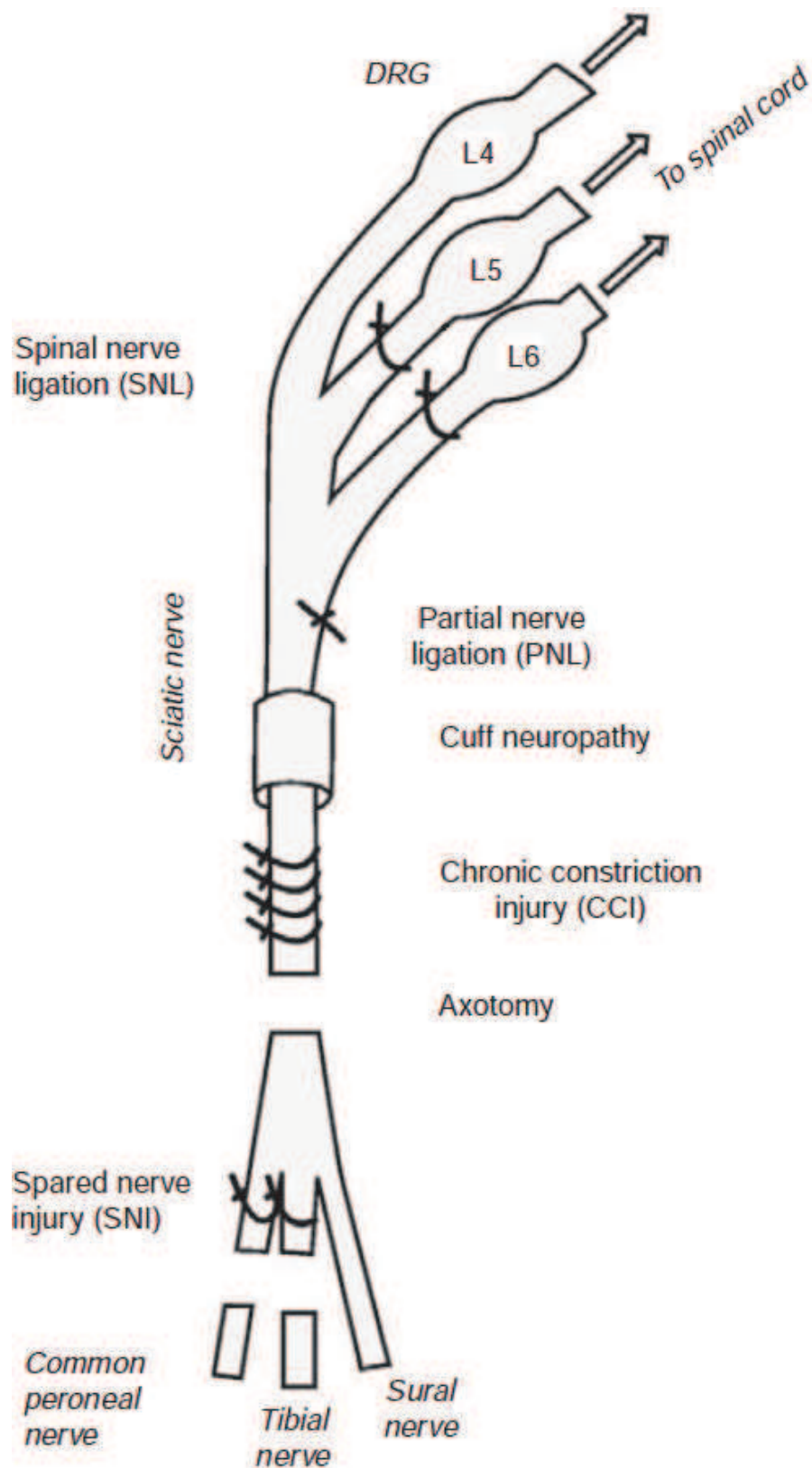
## **6. Ligature lâche chronique du nerf sciatique : Chronic Constriction Injury (CCI)**

Il s'agit d'un des modèles les plus utilisés pour mimer les neuropathies périphériques traumatiques de l'homme. Facile à réaliser, il consiste à apposer 3 à 4 ligatures lâches sur le tronc commun du nerf sciatique (Bennett and Xie, 1988). Ce modèle permet de combiner des phénomènes de compression nerveuse à une dégénérescence wallérienne et des phénomènes inflammatoires de l'épinèvre (Maves et al., 1993). Un œdème provoqué par la lésion va majorer les mécanismes de compression de l'axone. Ce modèle, par la forte réaction immunitaire qu'il induit, a donc une composante inflammatoire en plus de l'effet mécanique de constriction. Ce type de ligature entraîne une désafférentation partielle de la patte avec une perte importante de fibres myélinisées de gros diamètre (Gautron et al., 1990). Chez le rat comme chez la souris, les phénomènes d'hyperalgésie, d'allodynie et des comportements de douleurs spontanées apparaissent en 1 semaine et vont durer au moins 7 semaines (Dowdall et al., 2005). Les conséquences de cette ligature nerveuse ont été étudiées sur le plan électrophysiologique et histopathologique (Carlton et al., 1991; Gabay and Tal, 2004). L'inconvénient majeur présenté par ce modèle est la variabilité des résultats observés, probablement liée elle-même à la variabilité de la réalisation des ligatures, plus ou moins serrées. Cette variabilité rends la technique en partie opérateur-dépendante.

## **7. Enseignement du nerf sciatique par un manchon (Cuff)**

Dans le but de limiter la variabilité inter-opérateur liée aux techniques de ligature, Mosconi et Kruger ont proposé le modèle du cuff (Mosconi and Kruger, 1996). Cette technique permet, par un enseiment du tronc commun du nerf sciatique du rat, d'obtenir une lésion similaire à celle induite par le CCI mais encore plus facilement reproductible. Dans ce cas, la constriction se fait par l'intermédiaire d'un manchon de polyéthylène de caractéristiques standardisées et non plus par des ligatures. Caractérisé chez la souris par notre équipe (Benbouzid et al., 2008a), la procédure de ce modèle est décrite en détail dans le protocole suivant et fait l'objet d'un article illustré par des séquences vidéo intitulé « *The Sciatic Nerve Cuffing* ».

*Model of Neuropathic Pain in Mice* » et en cours de publication dans *The Journal of Visualized Experiments (JoVE)*. Nous avons utilisé ce modèle dans la majorité des travaux menés dans le cadre de ma thèse de science, et j'ai personnellement contribué au travail bibliographique d'une part, et aux tests de traitement par gabapentine d'autre part (figure 3. de l'article) de la publication suivante.



**Figure R-1.** Schéma des principaux modèles de lésions traumatiques du nerf sciatique, d'après Stemkowski et Smith, 2013.

## **B. The Sciatic Nerve Cuffing Model of Neuropathic Pain in Mice**

### **Authors:**

Ipek Yalcin, Salim Megat, Florent Barthas, Elisabeth Waltisperger, Mélanie Kremer, Eric Salvat, Michel Barrot

**Keywords:** Neuroscience, Pain, Neuropathic pain, Allodynia, von Frey, Mouse, Model, Sciatic, Cuff

### **Short abstract:**

Neuropathic pain is a consequence of a lesion or disease affecting the somatosensory system. The “cuff model” of neuropathic pain in mice consists in the implantation of a polyethylene cuff around the main branch of the sciatic nerve. Mechanical allodynia is tested using von Frey filaments.

### **Long abstract:**

Neuropathic pain arises as a consequence of a lesion or a disease affecting the somatosensory system. This syndrome results from maladaptive changes in injured sensory neurons and along the entire nociceptive pathway within the central nervous system. It is usually chronic and challenging to treat. In order to study neuropathic pain and its treatments, different models have been developed in rodents. These models derive from known etiologies, thus reproducing peripheral nerve injuries, central injuries, and metabolic-, infectious- or chemotherapy-related neuropathies. Murine models of peripheral nerve injury often target the sciatic nerve which is easy to access and allows nociceptive tests on the hind paw. These models rely on a compression and/or a section. Here, we present the detailed surgery procedure for the “cuff model” of neuropathic pain in mice. In this model, a cuff of PE-20 polyethylene tubing of standardized length (2 mm) is unilaterally implanted around the main branch of the sciatic nerve. It induces a long-lasting mechanical allodynia, i.e. a nociceptive response to a normally non-nociceptive stimulus, that can be evaluated by using von Frey filaments. We present the detailed protocol for model and testing procedures, and discuss the interest of this model for the study of neuropathic pain mechanism, of neuropathic pain sensory and anxiodepressive aspects, and of neuropathic pain treatments.

**Introduction:**

Neuropathic pain is usually chronic and arises as a consequence of a lesion or a disease affecting the somatosensory system. Maladaptive changes in injured sensory neurons and along the entire nociceptive pathway within the central nervous system participate to this complex syndrome. To preclinically study neuropathic pain and its treatments, various models have been developed in rodents (reviewed in 1, 2, 3).

Based on known etiologies, the models of neuropathic pain aim at reproducing peripheral nerve injuries, central injuries, trigeminal neuralgia, diabetic neuropathies, chemo-induced neuropathies, post-herpetic neuralgia, etc... Different murine models of peripheral nerve injury target the sciatic nerve and rely on a compression and/or a section. This nerve is indeed relatively easy to access, and nociceptive tests can be easily done based on hind paw withdrawal reflexes. The chronic constriction injury (CCI) (4, 5), the sciatic nerve cuffing (6, 7, 8, 9), the partial sciatic nerve ligation (PSL) (10), the spinal nerve ligation (SNL) (11), or the common peroneal nerve ligation (12) are examples of chronic nerve compression models. In the spared nerve injury (SNI) models, two of the three terminal branches of the sciatic nerve are tightly ligated followed by a distal axotomy, the third branch being left intact (13, 14, 15). The various models of neuropathic pain that target the sciatic nerve result in a chronic mechanical allodynia (a nociceptive response to a normally non-nociceptive stimulus) that concerns the injured hind paw.

Here, we present the detailed surgery procedure for the “cuff model” of neuropathic pain in mice that consists in the implantation of a polyethylene cuff around the main branch of the sciatic nerve (6, 7, 8, 9). We also detail the use of von Frey filaments to assess the mechanical allodynia which is a long lasting nociceptive symptom present in this model.

**Protocol text:**

Protocols have been approved by the “comité d'éthique en matière d'expérimentation animale de Strasbourg” (CREMEAS).



## **1. Baseline measurement prior to the surgery, using von Frey filaments**

- 1.1 Let the mice habituate to the animal facilities for at least 10 days to 2 weeks before initiating the testing procedures.
- 1.2 Habituate the mice to the von Frey testing set-up and procedure that are described in detail in section 4.
- 1.3 Before surgery, evaluate the mechanical thresholds with von Frey filaments on separate days until at least three stable consecutive values are obtained for paw withdrawal thresholds.
- 1.4 Assign the animals to the different experimental groups so that these groups do not initially differ for the mechanical nociceptive threshold.

## **2. Surgery procedures for cuff implantation**

- 2.1 Mouse body weight should be over 20 g for the cuff insertion procedure described below.
- 2.2 Anesthetize the animal with an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (17 mg/mL) and xylazine (2.5 mg/mL) in 0.9% NaCl, 4 mL/kg.
- 2.3 Check the paw reflexes by pinching a hind paw with tweezers and check the eye reflexes to make sure that animals are fully anesthetized.
- 2.4 Shave the right leg from the knee to the hip using an electric shaver.
- 2.5 Apply protective eye liquid gel to the eyes with a cotton-tipped swab.
- 2.6 Place the animal on its left side and place the right hind limb on a small pillow, maintain this limb to the pillow with adhesive tape.

- 2.7 Disinfect the surgery field with 70% ethanol using gauze pad or cotton-tipped swab.
- 2.8 Find the femur with your forefinger and make an approximately 0.5 cm incision parallel to the femur.
- 2.9 Separate the muscles close to the femur with two autoclaved sticks. Never cut the muscle. Normally, the muscle layers separate easily without any bleeding and the sciatic nerve appears. In case of bleeding, use sterile cotton-tipped swab to absorb the blood.
- 2.10 To expose the main branch of the sciatic nerve, insert two autoclaved sticks below the nerve and hydrate it with a physiological solution (0.9% NaCl).
- 2.11 Catch the pre-prepared sterile 2 mm section of split PE-20 polyethylene tubing (cuff), 0.38 mm ID / 1.09 mm OD, with the help of a pointed steel stick and a bulldog clamp. For this, insert the pointed steel stick into the cuff, which will slightly open it. Then insert the bulldog through the lateral opening of the cuff, rotate the bulldog (180°) so that it will hold the cuff by the opposite side to the lateral opening, close the bulldog and remove the pointed steel stick. The rotation is done to allow holding the cuff in an optimized position for the insertion, the bulldog clamp also help maintaining the cuff partly open. The model and size of the bulldog clamp is critical for this step of the procedure.
- 2.12 A second experimenter holds the two sticks under the nerve and gently separates them to facilitate the access to around 4 mm of the sciatic nerve. Then insert the 2 mm cuff around the main branch of the sciatic nerve, starting by inserting the part of the cuff that is distal to the bulldog around the part of the nerve that is proximal to the hip.
- 2.13 Once the cuff is in place, gently close it by exerting a pressure on its two distal sides with pliers, without squeezing or changing the form of the tube.
- 2.14 Suture the shaved skin layer with surgical knots.

2.15 Place the mouse on his left side in a clean home cage. Keep it under the heat lamp until it is awake.

2.16 Add extra water and place some chow directly in the home cage.

### **3. Surgery procedures for sham controls**

3.1 From steps 2.1 to 2.9 and steps 2.14 to 2.16, the procedures are identical as the ones described above for cuff implantation. The steps 2.10 to 2.13 of the cuff insertion are omitted in the sham controls.

### **4. von Frey testing**

4.1 Place the mice in clear individual Plexiglas® boxes (7 cm x 9 cm x 7 cm) with holes, on an elevated perforated plate of smooth stainless steel (100 cm x 50 cm, 5-mm circle perforations with 2.5 mm in between perforation borders. Up to 12 mice can be concomitantly tested on this set-up.

4.2 Allow the animals to habituate for 15 minutes prior to testing.

4.3 Verify that the mice are calm and apply the von Frey filaments to the plantar surface of each hind paw in a series of ascending forces. The von Frey filaments (or von Frey hairs) are calibrated plastic hairs, 5 cm long and of various diameters, fixed on applicators. Their end is not sharp but blunt. They are applied locally until they bend, at which point they exert a calibrated pressure. For the most common brand, the thinner filaments may go down to 0.008 g, and are far below detection threshold, whereas the larger ones can lead to a pressure up to 300 g. The speed of filament application, the degree of bending and the duration of the application are critical factors that influence the absolute values that are obtained with this test (3). With presently described procedures in mice (i.e. application of the filament until it just bends), the filaments that are normally used are the ones of 0.16, 0.4, 0.6, 1, 1.4, 2, 4, 6, 8, and 10 g. In C57BL/6J mice, the pre-surgery tests start with the 1.4 g filament as

these mice do not respond to the ones exerting lower pressure. After surgery, the tests start with the 0.4 g filament. Normally, responses are not positive with these first tested filaments, but if it happens, then test a filament of lower force at step 4.5.

- 4.4 Apply the chosen filament, until it just bends, three to five consecutive times to the plantar surface of the left paw, and then do the same to the right paw. Avoid paw lateral borders that can be more sensitive. The expected response is a paw withdrawal, sudden flinching or paw licking. The response is considered as positive if at least three expected responses are observed out of five trials. A given paw is always tested three times, but the 4<sup>th</sup> and the 5<sup>th</sup> trials are done only if 1 or 2 response(s) was (were) observed during the first three tests. Once the filament was tested on both paws, test the next animal.
- 4.5 Apply the same filament to the next animals according to the 4.4 procedure. Once all animals are tested, start again on the first animal with the next filament of greater force, repeat the procedure...
- 4.6 Each animal is tested until at two consecutive filaments are giving a positive response. The gram value of the lower filament that gave a positive response is considered as the paw withdrawal threshold for this animal.

#### **Representative results:**

With the procedures that are described above, the cuff implantation results in an ipsilateral allodynia, as illustrated in **Figure 1**. Once the mouse is habituated to the testing procedure, the values for paw withdrawal thresholds in the von Frey test remain stable over time and are not affected by the surgical procedure *per se*, as illustrated in Sham animals. It should however be noted that a transitory post-surgical allodynia can usually be observed in Sham mice. When such allodynia is present, the paw withdrawal response returns to baseline after a few days post-surgery. In Cuff mice, the ipsilateral allodynia is already present on the first days post-surgery and is maintained for more than 2 months (see **9**, and **Figure 1**). The cuff-induced allodynia remains ipsilateral in C57BL/6J mice measured by the von Frey test as detailed above, but in other conditions a presence of allodynia on the contralateral paw can

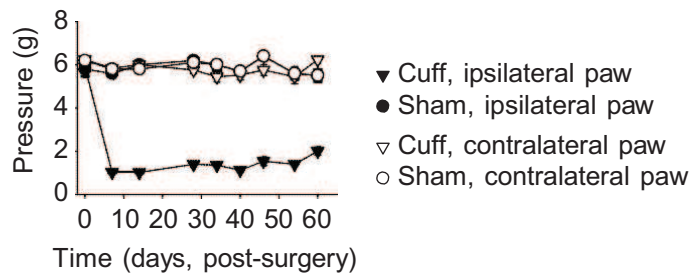
also be observed (8). The absolute values for baseline are usually between 4 and 6 g in C57BL/6J mice, but the testing protocol may affect these values (3).

In this model, the tricyclic antidepressant drug nortriptyline (5 mg/kg, intraperitoneal, twice a day) relieves the neuropathic allodynia after around 2 weeks of treatment, as illustrated in **Figure 2**. At this dose, no acute analgesic action of the antidepressant is observed (16, 17). To mimic the lasting pain relief that is present in patients taking such drugs, the mice can be tested before the morning drug administration rather than after. Such procedure allows assessing a long-lasting effect primed by previous days of treatment. In this case, it requires 1-2 weeks of treatment to observe a lasting relief of the neuropathic allodynia. When the treatment is interrupted, a relapse is usually observed within 3-4 days (18). Besides some antidepressants, gabapentins are the other first-choice treatments for neuropathic pain. Gabapentin has an acute and transitory analgesic action in this model (16), but it also displays a delayed and long-lasting antiallodynic action when testing the animal each day before the drug administration, as illustrated in **Figure 3**. This action is faster than with antidepressant drugs.

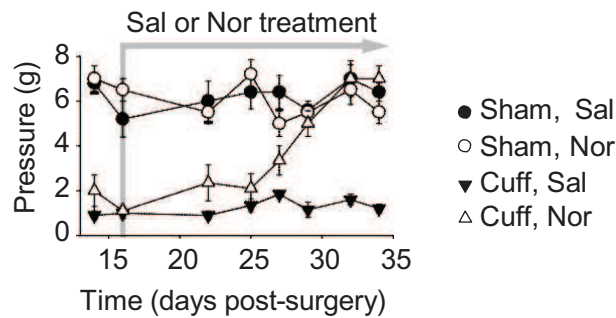
#### **Discussion:**

The “cuff” model was initially developed in rats to obtain a standardized and reproducible chronic constriction injury with the implantation of multiple cuffs around the sciatic nerve (6). It was then modified to implant a single cuff (7, 8), even though some groups also use multiple cuff insertion (19, 20, 21, 22). It was also adapted to mice (9, 23), which opened the possibility to use transgenic animals. The cuff is usually 2-mm long, but other lengths have also been used in rats (22). The polyethylene tubing depends on the species: PE-20 in mice (9), and PE-60 (24, 25) or PE-90 (7, 8, 26, 27) in rats.

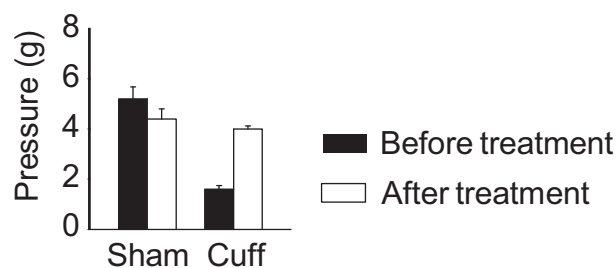
The mechanical allodynia is measured with von Frey hairs. In this test, the absolute values for paw withdrawal thresholds may depend upon the surface on which the animal stands (28) or upon the duration of filament bending (3), but these factors do not affect the detection of the neuropathic allodynia.



**Figure 1. Mechanical paw withdrawal thresholds in the cuff model of neuropathic pain in mice.** Adult male C57BL/6J mice were habituated to the von Frey procedure until a stable baseline was obtained (the baseline is represented at point 0 on the graph). Both paws were tested. The Cuff mice display ipsilateral mechanical allodynia as showed by the lowered paw withdrawal thresholds (n = 10 per group).



**Figure 2. Delayed antiallodynic action of a tricyclic antidepressant.** After two weeks post-surgery, mice received intraperitoneal treatment twice a day (morning and evening) with either 0.9% NaCl or 5 mg/kg nortriptyline hydrochloride (n = 5 or 6 per group). The von Frey test was done before the morning treatment. With this procedure, a delayed antiallodynic action of nortriptyline is observed, which requires around 12 days of treatment.



**Figure 3. Antiallodynic action of a gabapentinoid.** After three weeks post-surgery, mice received intraperitoneal treatment twice a day (morning and evening) with either 0.9% NaCl or 10 mg/kg gabapentin (n = 5 per group). The von Frey test was done before the morning treatment. With this procedure, a delayed and lasting antiallodynic action of gabapentin is observed. Data are presented before starting the treatments and at the 6th day of treatments.

The “cuff” model is of interest for the study of neuropathic pain mechanisms. It was used to study morphological changes in myelinated and unmyelinated fibers (6, 29), and functional changes in sensory neurons, primary afferents and spinal neurons (19, 21, 22, 30, 31, 32, 33, 34, 35). It allowed demonstrating that glial activation and a central shift in neuronal action gradient participate to changes in the activity and the responses of spinal nociceptive neurons and to neuropathic allodynia (24, 36, 37, 38). The influences of glutamate receptors (7, 39, 40, 41), of opioid receptors (16, 42, 43, 44, 45) and of nicotinic receptors (46) were also studied in this model.

Another interest of the model is its response to actual treatments of neuropathic pain, i.e. gabapentins and antidepressants. Similar to clinical observations: gabapentins display both an acute short-lasting analgesic action at high dose and a delayed sustained relieving action that appears after 2-4 days of treatment, tricyclic antidepressants and selective serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors have no acute analgesic effect at relevant dose but display a delayed sustained relieving action that requires 1-2 weeks of treatment, and the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine is ineffective (16). The model is thus appropriate to study the molecular mechanism underlying these treatments (16, 17, 18, 44, 45, 47), which may reveal new therapeutic targets to test in patients (48, 49, 50, 51).

Last, the model also allows studying the anxiodepressive consequences of neuropathic pain. Clinically, these consequences affect around a third of neuropathic pain patients but are preclinically less studied than the sensory aspects of pain. In this model, a time-dependent development of anxiety-like and depressive-like phenotypes is present (52) and the related mechanism can thus be addressed.

The standardized cuffs and procedures in this mouse model of neuropathic pain result in low interindividual variability for the mechanical allodynia. The possibility to use genetically modified animals (17, 18, 44, 45, 46, 47, 52), the long-lasting allodynia, the response to clinically used treatments and the time-dependent development of anxiodepressive symptoms make this model appropriate for the study of the various

aspects and consequences of neuropathic pain and its treatments, which already brought valuable information to this field of research.

**Acknowledgements:** This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (contract UPR3212), the University of Strasbourg and by a NARSAD Young Investigator Grant from the Brain & Behavior Research Foundation.

**Disclosure:** The authors declare that they have no competing financial interests.

### References:

1. Colleoni, M. & Sacerdote, P. Murine models of human neuropathic pain. *Biochim. Biophys. Acta.* **1802**, 924-933 (2010).
2. Jaggi, A.S., Jain, V., & Singh, N. Animal models of neuropathic pain. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **25**, 1-28 (2011).
3. Barrot, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience.* **211**, 39-50 (2012).
4. Bennett, G.J. & Xie, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain.* **33**, 87-107 (1988).
5. Austin, P.J., Wu, A., & Moalem-Taylor, G. Chronic constriction of the sciatic nerve and pain hypersensitivity testing in rats. *J. Vis. Exp.* **13**, 61 (2012).
6. Mosconi, T. & Kruger, L. Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy: ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations. *Pain.* **64**, 37-57 (1996).
7. Fisher, K., Fundytus, M.E., Cahill, C.M., & Codeine, T.J. Intrathecal administration of the mGluR compound, (S)-4CPG, attenuates hyperalgesia and allodynia associated with sciatic nerve constriction injury in rats. *Pain.* **77**, 59-66 (1998).
8. Pitcher, G.M., Ritchie, J., & Henry, J.L. Nerve constriction in the rat: model of neuropathic, surgical and central pain. *Pain.* **83**, 37-46 (1999).
9. Benbouzid, M., *et al.* Sciatic nerve cuffing in mice: a model of sustained neuropathic pain. *Eur. J. Pain.* **12**, 591-599 (2008).
10. Seltzer, Z., Dubner, R., & Shir, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain.* **43**, 205-218 (1990).



11. Kim, S.H. & Chung, J.M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*. **50**, 355-363 (1992).
12. Vadakkan, K.I., Jia, Y.H., & Zhuo, M. A behavioral model of neuropathic pain induced by ligation of the common peroneal nerve in mice. *J. Pain*. **6**, 747-756 (2005).
13. Decosterd, I. & Woolf, C.J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*. **87**, 149-158 (2000).
14. Shields, S.D., Eckert, W.A., & Basbaum, A.I. Spared nerve injury model of neuropathic pain in the mouse: a behavioral and anatomic analysis. *J. Pain*. **4**, 465-470 (2003).
15. Richner, M., Bjerrum, O.J., Nykjaer, A., & Vaegter, C.B. The spared nerve injury (SNI) model of induced mechanical allodynia in mice. *J. Vis. Exp.* **18**, 54 (2011).
16. Benbouzid, M., *et al.* Chronic, but not acute, tricyclic antidepressant treatment alleviates neuropathic allodynia after sciatic nerve cuffing in mice. *Eur. J. Pain*. **12**, 1008-1017 (2008).
17. Yalcin, I., *et al.*  $\beta$ 2-adrenoceptors are essential for desipramine, venlafaxine or reboxetine action in neuropathic pain. *Neurobiol. Dis.* **33**, 386-394 (2009).
18. Yalcin, I., *et al.*  $\beta$ 2-adrenoceptors are critical for antidepressant treatment of neuropathic pain. *Ann. Neurol.* **65**, 218-225 (2009).
19. Balasubramanian, S., Stemkowski, P.L., Stebbing, M.J., & Smith, P.A. Sciatic chronic constriction injury produces cell-type-specific changes in the electrophysiological properties of rat substantia gelatinosa neurons. *J. Neurophysiol.* **96**, 579-590 (2006).
20. Ikeda, T., *et al.* Effects of intrathecal administration of newer antidepressants on mechanical allodynia in rat models of neuropathic pain. *Neurosci. Res.* **63**, 42-46 (2009).
21. Thakor, D.K., *et al.* Increased peripheral nerve excitability and local NaV1.8 mRNA up-regulation in painful neuropathy. *Mol. Pain*. **5**, 14 (2009).
22. Zhu, Y.F., Wu, Q., & Henry, J.L. Changes in functional properties of A-type but not C-type sensory neurons in vivo in a rat model of peripheral neuropathy. *J. Pain Res.* **5**, 175-192 (2012).
23. Cheng, H.Y., *et al.* DREAM is a critical repressor for pain modulation. *Cell* **108**, 31-43 (2002).

24. Zhang, J. & De Koninck, Y. Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury. *J. Neurochem.* **97**, 772-783 (2006).
25. Beggs, S., Liu, X.J., Kwan, C., & Salter, M.W. Peripheral nerve injury and TRPV1-expressing primary afferent C-fibers cause opening of the blood-brain barrier. *Mol. Pain.* **6**, 74 (2010).
26. Vachon, P., Massé, R., & Gibbs, B.F. Substance P and neurotensin are up-regulated in the lumbar spinal cord of animals with neuropathic pain. *Can. J. Vet. Res.* **69**, 86-92 (2004).
27. Aouad, M., Petit-Demoulière, N., Goumon, Y., & Poiseau, P. Etifoxine stimulates allopregnanolone synthesis in the spinal cord to produce analgesia in experimental mononeuropathy. *Eur. J. Pain.* In Press, (2013).
28. Pitcher, G.M., Ritchie, J., & Henry, J.L. Paw withdrawal threshold in the von Frey hair test is influenced by the surface on which the rat stands. *J. Neurosci. Meth.* **87**, 185-193.
29. Beaudry, F., Girard, C., & Vachon, P. Early dexamethasone treatment after implantation of a sciatic-nerve cuff decreases the concentration of substance P in the lumbar spinal cord of rats with neuropathic pain. *Can. J. Vet. Res.* **71**, 90-97 (2007).
30. Pitcher, G.M. & Henry, J.L. Cellular mechanisms of hyperalgesia and spontaneous pain in a spinalized rat model of peripheral neuropathy: changes in myelinated afferent inputs implicated. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 2006-2020 (2000).
31. Pitcher, G.M. & Henry, J.L. Nociceptive response to innocuous mechanical stimulation is mediated via myelinated afferents and NK-1 receptor activation in a rat model of neuropathic pain. *Exp. Neurol.* **186**, 173-197 (2004).
32. Pitcher, G.M. & Henry, J.L. Governing role of primary afferent drive in increased excitation of spinal nociceptive neurons in a model of sciatic neuropathy. *Exp. Neurol.* **214**, 219-228 (2008).
33. Lu, V.S., *et al.* Brain-derived neurotrophic factor drives the changes in excitatory synaptic transmission in the rat superficial dorsal horn that follow sciatic nerve injury. *J. Physiol.* **587**, 1013-1032 (2009).
34. Ruangsri, S., Lin, A., Mulpuri, Y., Lee, K., Spigelman, I., & Nishimura, I. Relationship of axonal voltage-gated sodium channel 1.8 (NaV1.8) mRNA accumulation to

- sciatic nerve injury-induced painful neuropathy in rats. *J. Biol. Chem.* **286**, 39836-39847 (2011).
35. Zhu, Y.F. & Henry, J.L. Excitability of A $\beta$  sensory neurons is altered in an animal model of peripheral neuropathy. *BMC Neurosci* **30**, 13:15 (2012).
  36. Coull, J.A., *et al.* Trans-synaptic shift in an ion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature*. **424**, 938-942 (2003).
  37. Coull, J.A., *et al.* BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*. **438**, 1017-1021 (2005).
  38. Keller, A.F., Beggs, S., Salter, M.W., & De Koninck, Y. Transformation of the output of spinal lamina I neurons after nerve injury and microglia stimulation underlying neuropathic pain. *Mol. Pain*. **3**, 27 (2007).
  39. Fundytus, M.E., Fisher, K., Dray, A., Henry, J.L., &Coderre, T.J. In vivo antinociceptive activity of anti-rat mGluR1 and mGluR5 antibodies in rats. *Neuroreport*. **9**, 731-735 (1998).
  40. Fundytus, M.E., *et al.* Knockdown of spinal metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR(1)) alleviates pain and restores opioid efficacy after nerve injury in rats. *Br. J. Pharmacol* **132**, 354-367 (2001).
  41. Coderre, T.J., Kumar, N., Lefebvre, C.D., & Yu, J.S. Evidence that gabapentin reduces neuropathic pain by inhibiting the spinal release of glutamate. *J. Neurochem.* **94**, 1131-1139 (2005).
  42. Kabli, N. & Cahill, C.M. Anti-allodynic effects of peripheral delta opioid receptors in neuropathic pain. *Pain*. **127**, 84-93 (2007).
  43. Holdridge, S.V. & Cahill, C.M. Spinal administration of a delta opioid receptor agonist attenuates hyperalgesia and allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Eur. J. Pain*. **11**, 685-693 (2007).
  44. Benbouzid, M., *et al.*  $\delta$ -opioid receptors are critical for tricyclic antidepressant treatment of neuropathic allodynia. *Biol. Psychiatry*. **63**, 633-636 (2008).
  45. Bohren, Y., *et al.*  $\mu$ -opioid receptors are not necessary for nortriptyline treatment of neuropathic allodynia. *Eur. J. Pain*. **14**, 700-704 (2010).
  46. Yalcin, I., *et al.* Nociceptive thresholds are controlled through spinal  $\beta$ 2-subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors. *Pain*. **152**, 2131-2137 (2011).
  47. Bohren, Y., *et al.* Antidepressants suppress neuropathic pain by a peripheral  $\beta$ 2-adrenoceptor mediated anti-TNF $\alpha$  mechanism. *Neurobiol. Dis.* In Press, (2013).

48. Choucair-Jaafar, N., Yalcin, I., Rodeau, J.L., Waltisperger, E., Freund-Merzier, M.J., & Barrot, M.  $\beta$ 2-adrenoceptor agonists alleviate neuropathic allodynia in mice after chronic treatment. *Br. J. Pharmacol* **158**, 1683-1694 (2009).
49. Yalcin, I, *et al*. Chronic treatment with agonists of  $\beta$ 2-adrenergic receptors in neuropathic pain. *Exp. Neurol* **221**, 115-121 (2010).
50. Cok, O.Y., Eker, H.E., Yalcin, I., Barrot, M., & Aribogan, A. Is there a place for  $\beta$ -mimetics in clinical management of neuropathic pain? Salbutamol therapy in six cases *Anesthesiology*. **112**, 1276-1279 (2010).
51. Choucair-Jaafar, N., *et al*. Cardiovascular effects of chronic treatment with a  $\beta$ 2-adrenoceptor agonist relieving neuropathic pain in mice. *Neuropharmacology*. **61**, 51-60 (2011).
52. Yalcin, I, *et al*. A time-dependent history of mood disorders in a murine model of neuropathic pain. *Biol Psychiatry*. **70**, 946-953 (2011).

## Ré sulta ts : c ha pitre II.

---

### Do uleu rs chro nique s et ana lgé sie pré ve nti ve

#### A. Introduction

Les douleu rs chro nique s post-c hirurgic ale s (DCPC) sont fré que nte s et le s chirurgie s le s plus pou rvo ye use s sont ce lle s qui impliq uent une lé sion nerve use , co mme la tho raco tomie ou la chirurgie du cance r du sein (Martinez et al., 2013). De s caracté ristique s neuropathique s sont identifié e s dans la majorité de s DCPC (Johansen et al., 2012) et on peut é mett re l'hypothè se que de s mé canisme s neuropathique s sont à l'origine de la plu part de s DCPC. Mê me s'il n'impliq ue pas de lé sion nerve use majeure , tout geste chirurgic al entra îne obligato ire ment une ré ac tion inflamma to ire et le s mé dia teu rs de l'inflamma tion, issu s de s tissu s lésé s, vont ac tiver le s nocicepteu rs et le s sensibilise r. L'amplificati on de la ré ac tivité de s nocicepteu rs participe aux phé no mène s d'hyperalgé sie post-opé ratore observé e sur le site de la lé sion chirurgic ale. L'hyperalgé sie primaire se définit par sa localisati on au nive au de la lé sion elle-mê me et s'expliq ue par cette sensibilisati on pé riphé rique de s nocicepteu rs. L'hyperalgé sie secondaire s'étend au-delà du site lé sion nel et reflè te la partic ipati on d'une sensibilisati on du systè me nerve ux central, consé que nce de l'ac tivati on initiale de s nocicepteu rs pé riphé riques. Ac c ompagné e de phé no mène s d'allodynie mé canique et thermique , l'hyperalgé sie post-c hirurgic ale présente une exte nsion topogra phique très variable se lon le s pa tie nts et son é te ndue pou rrait ê tre un fac te ur de risq ue de dé ve lopp er une DCPC (Eisenach, 2006). Ré tro spec tive ment, une allodynie mé canique associé e à une hypo esthésie est plus fré que nte che z le s pa tie nts qui souffrent de DCPC après une cure chirurgic ale d'hemie inguinale (Mikkelsen et al., 2004). Une é tude ré ce nte est venue confirmer la pré dic tivité de l'hyperalgé sie secondaire post-opé ratore dans le risq ue de survenue de DCPC (Martinez et al., 2012b). Il est donc lé gitime de cibler ce s phé no mène s d'hyperalgé sie et d'allodynie dans le traiteme nt de s douleu rs post-c hirurgic ale s aiguë s dans le but de diminuer le risq ue de dé ve lopp eme nt d'une DCPC. Pour cela, de s traiteme nts antihyperalgé siques se sont rajouté s aux antalgique s dans la prise en charge de s douleu rs post-c hirurgic ale s. Ceci est d'autant plus né cessaire que l'hyperalgé sie et l'allodynie vont se rajouter aux douleu rs aiguë s ressentie s par le pa tie nt et augmenter la consommation d'antalgique s, en partic ulier d'opioïde s. Or le s opioïde s eux-mê me s ont un effet

hyperalgésique observé en période post-chirurgicale (Angst and Clark, 2006). Cet effet prohyperalgésique est paradoxal pour des molécules utilisées à visée antinoceptive. L'effet des fortes doses d'opioïdes est d'activer la protéine kinase C, ce qui entraîne la phosphorylation des récepteurs NMDA postsynaptiques et les rend plus sensibles au glutamate. Ce mécanisme est dose-dépendant et s'accompagne d'une tolérance aiguë aux opioïdes (Konopka and van Wijhe, 2010). Récemment, il a également été montré que l'hyperalgésie induite par la morphine implique le co-transporteur membranaire  $K^+$  et  $Cl^-$  (KCC2) et les cellules microgliales de la corne dorsale (Fermi et al., 2013). La réduction des dosages en opioïdes pour en limiter les effets indésirables a été à l'origine du concept d'analgésie multimodale ou balancée qui associe plusieurs antalgiques complémentaires avec des cibles pharmacologiques différentes (Kehlet and Dahl, 1993). Un exemple en est l'association de morphine et d'anti-inflammatoires non stéroïdien (AINS) : les AINS ont montré un effet d'antagonisme de l'hyperalgésie induite par la morphine et permettent de diminuer les scores de douleurs aiguës post-chirurgicales (Jin and Chung, 2001; Kang et al., 2002). Pour contrecarrer l'effet hyperalgésique des opioïdes, il est légitime d'associer à cette analgésie multimodale des molécules antihyperalgésiques, comme la kétamine. La kétamine a de nombreuses propriétés mais aux doses utilisées en postopératoire chez l'homme, c'est l'antagonisme non compétitif des récepteurs NMDA qui est recherché. La kétamine a un effet sur l'hyperalgésie induite par les opioïdes aussi bien que sur l'hyperalgésie induite par la chirurgie (Schulte et al., 2004; Subramaniam et al., 2004). D'autres molécules se sont récemment rajoutées à cette analgésie multimodale : les gabapentinoïdes. La gabapentine est utilisée depuis quelques années en période préopératoire : une prémédication par une dose unique de gabapentine permet de réduire la consommation post-chirurgicale immédiate en morphine (Ho et al., 2006). La prégabaline a également montré son intérêt dans cette indication (Zhang et al., 2011). Mais il n'y a pour l'instant pas suffisamment de preuves pour proposer en routine ces traitements en prévention des DCPC (Schmidt et al., 2013).

A ce concept d'analgésie multimodale, se rajoutent ceux d'analgésie « préemptive » des anglo-saxons : le principe est d'anticiper les douleurs liées à la chirurgie pour en diminuer l'impact par l'administration d'antalgiques avant l'incision (Wall, 1988). Ce concept a par la suite évolué pour devenir une analgésie préventive, qui vise cette fois à empêcher la survenue de douleurs à distance de

l'effet pharmacologique du traitement. Il ne s'agit plus simplement d'anticiper la douleur mais d'instaurer, avant, pendant ou après la chirurgie un traitement avec un effet protecteur (Pogatzki-Zahn and Zahn, 2006; Katz et al., 2011). L'effet de la gabapentine par exemple, sur les douleurs post-chirurgicales aiguës n'est pas influencé par le moment de l'administration (Pandey et al., 2005).

A ces associations médicamenteuses se sont rajoutées des techniques d'anesthésie loco-régionale. Les anesthésiques locaux, comme la lidocaïne, la marcaine ou la bupivacaïne agissent en bloquant les canaux sodium voltage-dépendants (Attal and Bouhassira, 2006). Administrés sous forme de blocs nerveux, *in situ* ou par voie péridurale, ils permettent un meilleur contrôle de la douleur aiguë mais aussi de diminuer la survenue de douleurs chroniques (Kairaluoma et al., 2006; Yanagida and Strichartz, 2006; Singh et al., 2007). Il est intéressant de noter que la lidocaïne a également été étudiée dans son administration intra-veineuse en péri-opératoire avec un effet favorable sur les douleurs aiguës (Kaba et al., 2007).

Pour les études précliniques des douleurs post-opératoires, des modèles animaux ont été caractérisés avec la reproduction des gestes chirurgicaux tels qu'incisions cutanées et musculaires (Xu and Brennan, 2009). Ces modèles présentent un intérêt dans l'étude des conséquences immédiates de lésions tissulaires périphériques sur les nocicepteurs et permettent l'étude d'antalgiques sur la période post-opératoire précoce. Bien qu'il ne soit pas observé de modification de l'activité des nocicepteurs à long-terme avec ces modèles, il a été observé que de telles lésions prédisposent à une plus grande sensibilité à la douleur si une seconde lésion est réitérée à plusieurs semaines de distance (Laboueyras et al., 2009). Les modèles de douleur inflammatoire sont également utilisés pour étudier les conséquences à court-terme de lésion inflammatoire sur les fonctions sensorielles et nociceptives (Mogil, 2009). Mais les modèles qui se rapprochent le plus de l'impact à long-terme d'une association d'inflammation et de lésion nerveuse sont les modèles de lésions traumatiques tronculaire ou radiculaire de nerfs périphériques (sciatique ou trigéminal). L'abord du nerf, avant de poser une ligature ou un dispositif de compression, passe par une procédure qui mime une procédure chirurgicale classique chez l'homme. Dans ces modèles, les animaux présentent précocement une allodynie et une hyperalgésie, qui vont toutes deux perdurer comme on peut

l'observer dans les douleurs neuropathiques chroniques post-chirurgicales chez l'homme.

Dans cette partie de notre travail de thèse, nous avons choisi d'étudier l'impact de la période d'administration d'un traitement sur l'allodynie mécanique statique induite par la pose d'un manchon sur le nerf sciatique. La technique chirurgicale et les caractéristiques du modèle du cuff utilisé sont décrites dans le paragraphe correspondant. Une période de traitement, qualifiée de tardive, démarre plus de 3 semaines après la chirurgie et dure 10 à 15 jours selon les molécules. Une autre période de traitement, considérée comme précoce, démarre avec une première administration au moins 1 heure avant la chirurgie du cuff. Nous avons testé dans ces 2 périodes, précoce et tardive, la kétamine utilisée habituellement chez l'homme en situation péri-chirurgicale mais aussi des traitements recommandés dans le traitement des douleurs neuropathiques installées (antiépileptiques et antidépresseurs). Nous avons également testé la terbuthaline, dont l'administration chez la souris a le même effet que des antidépresseurs tricycliques sur l'allodynie neuropathique. Enfin, nous avons testé dans ce modèle la dexaméthasone pour ses propriétés anti-inflammatoires. Les résultats de ce travail sont présentés dans l'article suivant, en cours de rédaction.



## **B. Traitements précoces et tardifs de l'allodynie neuropathique : analgésie préventive des antiépileptiques gabapentine et carbamazépine.**

Eric Salvat, Ipek Yalcin, André Muller, Michel Barrot

### **1. Introduction**

Les douleurs neuropathiques sont définies par l'International Association for the Study of Pain (IASP) comme étant des douleurs secondaires à une lésion ou une maladie affectant le système somatosensoriel (Treede et al., 2008). Ces douleurs sont généralement chroniques, invalidantes et peu soulagées par les antalgiques usuels (Attal et al., 2006). Affectant la qualité de vie des patients, les douleurs neuropathiques chroniques représentent un coût important pour la société (O'Connor, 2009). En France, la prévalence des douleurs chroniques ayant des caractéristiques neuropathiques est évaluée à 6,9% de la population générale (Bouhassira et al., 2008). Des douleurs neuropathiques chroniques peuvent survenir dans les suites d'une intervention chirurgicale, avec une prévalence estimée entre 6 et 68% selon le type de chirurgie (Martinez et al., 2013). Le concept d'analgésie préventive vise à diminuer la survenue de ce type de douleurs par un traitement instauré en période périopératoire mais les modalités d'application et d'études de l'impact de cette analgésie ne sont pas encore consensuelles (Kissin, 2005). Les modèles animaux de lésions nerveuses du nerf sciatique permettent de reproduire les caractéristiques des douleurs neuropathiques chroniques d'origine lésionnelle et d'étudier les effets des traitements selon leur période d'instauration.

Dans notre étude, nous avons utilisé le modèle du cuff (Bennett and Xie, 1988) caractérisé chez la souris dans notre laboratoire (Benbouzid et al., 2008a) pour tester des molécules à visée antihyperalgésique ou issues de classes pharmacologiques recommandées dans le traitement des douleurs neuropathiques (Attal et al., 2010). Nous avons étudié les effets d'un traitement par différents antidépresseurs comme la désipramine, la duloxétine et la fluoxétine ou antiépileptiques comme la gabapentine et la carbamazépine. Nous avons également testé la terbuthaline dont notre équipe a montré l'effet sur l'allodynie neuropathique (Yalcin et al., 2010), la kétamine utilisée de façon courante comme antihyperalgésique en période périopératoire chez l'homme (Weinbrum, 2012) et la dexaméthasone pour ses vertus antiinflammatoires avérées dans le modèle du cuff (Beaudry et al., 2007).

L'objectif de cette étude est de comparer les effets de ces différents traitements en fonction de leur instauration précoce, avant la chirurgie, ou tardive sur l'allodynie mécanique induite chez la souris dans le modèle du cuff.

## 2. Méthodes

### 2.1. Animaux

Des souris adultes mâles C57BL/6J âgées de 6 semaines (Charles River, L'Arbresle, France) ont été utilisées dans les travaux expérimentaux de nos études. Les animaux sont répartis en cages de 4 ou 5 individus, soumis à des cycles de lumière/obscurité de 12 heures (lumières allumées le matin à 6h00). La nourriture et l'eau de boisson sont disponibles *ad libitum*. Les travaux expérimentaux débutent après 2 semaines d'habituation des animaux à l'environnement de l'animalerie. L'animalerie est légalement autorisée à l'expérimentation animale et enregistrée avec l'agrément B67-482-1. Les scientifiques en charge des études détiennent une autorisation d'expérimentation sur l'animal délivrée par les autorités vétérinaires et sanitaires françaises. Toutes les procédures sont réalisées en respect des Bonnes Pratiques de Laboratoire pour l'expérimentation animale, énoncées par l'Association Internationale pour l'Etude de la Douleur (IASP) et selon les directives européennes 86/609/EEC.

### 2.2. Chirurgie

La douleur neuropathique chronique est induite par la pose d'un manchon (cuff) sur le tronc du nerf sciatique. Ce modèle du cuff a été caractérisé chez le rat (Mosconi and Kruger, 1996) et plus récemment chez la souris (Benbouzid et al., 2008a). La chirurgie a été effectuée sous anesthésie générale par injection intrapéritonéale (i.p.) de 4 mL/kg de kétamine/xylazine : kétamine (17 mg/mL), xylazine (2,5 mg/mL) (Centravet, Tâden, France). En condition d'asepsie, une incision cutanée au niveau de la cuisse a permis de mettre en évidence puis de dégager le tronc commun du nerf sciatique droit. Un manchon de polyéthylène long de 2 mm, de diamètre interne de 0,38 mm et de diamètre externe de 1,09 mm (Harvard Apparatus, Les Ulis, France) est posé autour du nerf sciatique droit des animaux (groupe cuff). Le groupe contrôle (groupe sham) est constitué d'animaux qui ont subi la même procédure mais sans pose du manchon. Les animaux sont répartis avant la chirurgie dans les différents groupes expérimentaux en fonction de leurs poids et de leurs seuils de réponse aux tests nociceptifs, afin d'équilibrer les groupes.

### 2.3. Molécules et procédures de traitement

Les molécules testées appartiennent à différentes classes pharmacologiques: antidépresseur et  $\beta_2$ -agoniste, antiépileptique et coanalgésiques (kétamine et corticoïde). Dans le groupe 1, traité par des antidépresseurs et un  $\beta_2$ -agoniste, les molécules utilisées sont la désipramine (5mg/kg), le chlorhydrate de duloxétine (10mg/kg), le chlorhydrate de fluoxétine (10mg/kg) pour les antidépresseurs, ou le sulfate de terbuthaline (0,5mg/kg) en  $\beta_2$ -agoniste. Dans le groupe 2, traité par antiépileptiques, la gabapentine (10mg/kg) ou la carbamazépine (40mg/kg) ont été injectées. Dans le groupe 3, de la kétamine (15mg/kg) ou du phosphate sodique de dexaméthasone (2mg/kg) ont été injectées. Les molécules et leur solvant (solution saline 9%) ont été injectées par voie i.p. matin et soir, exception faite de la

carbamazépine (injectée matin et soir) et de la dexaméthasone (injectée 1 fois par jour le matin) administrées par voie sous-cutanée (s.c.). Ces molécules proviennent de Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France. Dans chaque groupe et pour toutes les molécules, un sous-groupe de souris est traité de façon précoce (1<sup>ère</sup> injection 1 heure avant la chirurgie du cuff) et un autre sous-groupe est traité de façon tardive (1<sup>ère</sup> injection 25 jours après la chirurgie). Les traitements, précoces et tardifs, sont d'une durée de 15 jours pour les antidépresseurs et la terbuthaline, et d'une durée de 10 jours pour les antiépileptiques, la kétamine et la dexaméthasone.

#### **2.4. Tests nociceptifs**

Des filaments calibrés de von Frey (Bioseb, Chaville, France) ont été utilisés pour déterminer le seuil mécanique du retrait des pattes postérieures, avec des résultats exprimés en grammes (Chaplan et al., 1994). Les souris sont disposées dans des boîtes transparentes en Plexiglas® (7cm x 9cm x 7cm) sur une grille métallique surélevée. Après une période d'habituation de 15 minutes, les filaments de von Frey sont appliqués sur la surface plantaire de chaque patte postérieure, selon une série ascendante de 0,07 à 10 g (Fig 1.C). Le seuil est déterminé par le premier filament entraînant au moins 3 retraits de la patte sur 5 applications. Ce test, appliqué dans des conditions de calme, à distance d'évènements stressants (injections, soins), est effectué régulièrement, à plusieurs reprises avant l'intervention chirurgicale (ligne de base) et poursuivi plusieurs semaines après, jusqu'à 50 jours pour les groupes traités par antidépresseurs et 60 jours pour les groupes traités par antiépileptiques ou coanalgésiques. Pour évaluer l'effet des traitements sans interférences avec un effet aigu, les tests ont été réalisés le matin avant les injections.

#### **2.5. Analyses statistiques**

Les données sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  l'erreur standard à la moyenne (SEM). Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide du programme Statistica (Statsoft, USA), en utilisant des ANOVA à plusieurs niveaux. La procédure chirurgicale (sham vs. cuff) ou le type de traitement (solution de NaCl 9‰ vs molécules injectées) sont considérés comme des variables indépendantes car obtenues pour des animaux différents. Les points temporels sont analysés comme des variables dépendantes car évalués pour les mêmes animaux. Lorsque l'ANOVA est significative ( $p < 0,05$ ), des comparaisons multiples sont réalisées en utilisant le post-test de Duncan.

### **3. Résultats**

#### **3.1. Allodynie mécanique statique**

Le seuil nociceptif mécanique des animaux, déterminé grâce aux filaments de von Frey avant la chirurgie, constitue la ligne de base observée du jour -10 au jour 0, le jour 0 correspondant au jour du geste chirurgical. Les tests montrent ensuite que le seuil de réponse de la patte postérieure droite des animaux du groupe cuff s'effondre de façon soutenue après la pose du manchon de polyéthylène (Effet

Chirurgie,  $F_{1,16}=225,9$ ,  $p<0,0001$ ), révélant une allodynie mécanique statique chronique. Le seuil de réponse de la patte droite des animaux du groupe sham baisse transitoirement les 2 premiers jours post-chirurgie avant de retrouver rapidement des valeurs de base (post-hoc :  $p<0,05$  par rapport à la ligne de base pour les jours 1 et 2 post-chirurgie).

### **3.2. Groupe 1 : traitement par des antidépresseurs ou de la terbuthaline**

#### **3.2.1. Traitement par désipramine**

3.2.1.1. Traitement précoce : l'injection de désipramine (5 mg/kg) ou de solution saline 9‰ commence 1 heure avant la chirurgie et se poursuit deux fois par jour pendant 15 jours pour les animaux cuff et les animaux sham. Le traitement par la solution saline ou la désipramine ne modifie pas le seuil de réponse des animaux. (Interaction Chirurgie x Traitement x Temps,  $F_{13,28}=0,73$ ,  $p=0,72$ ). A la fin des 15 jours de traitement et jusqu'au 50<sup>ème</sup> jour de test aucun effet de la désipramine administrée de J0 à J15 n'est observé (**figure 1A**).

3.2.1.2. Traitement tardif : l'injection de désipramine (5 mg/kg) ou de solution saline 9‰ débute au 25<sup>ème</sup> et se termine au 40<sup>ème</sup> jour post-chirurgie. Au démarrage du traitement, les animaux du groupe cuff présentent une allodynie mécanique soutenue de la patte droite depuis la pose du manchon alors que dans le groupe sham les valeurs des seuils de réponse correspondent aux valeurs de base. Le seuil de réponse de la patte postérieure droite des animaux du groupe cuff traités par la désipramine montre une récupération au 9<sup>ème</sup> jour de traitement (Interaction Chirurgie x Traitement x Temps,  $F_{13,28}=3,50$ ,  $p<0,001$  ; post-hoc : cuff désipramine > cuff saline à  $p<0,0001$  du jour 34 à 42). Une rechute de l'allodynie neuropathique est ensuite observée chez ces animaux 5 jours après l'arrêt du traitement, au jour 45 (post-hoc : cuff désipramine < sham à  $p<0,0001$ ). Le seuil de réponse des animaux du groupe cuff traités par solution saline 9‰ reste inchangé, l'allodynie installée se poursuivant 50 jours après la chirurgie. De même, le traitement par la désipramine n'a aucun effet chez les animaux sham, c'est-à-dire non neuropathiques (**figure 1B**).

#### **3.2.2. Traitement par duloxétine**

3.2.2.1. Traitement précoce : l'injection de duloxétine (10 mg/kg) ou de solution saline 9‰ commence 1 heure avant la chirurgie et se poursuit deux fois par jour pendant 15 jours pour les animaux cuff et les animaux sham. Le traitement par la solution saline ou la duloxétine ne modifie pas le seuil de réponse des animaux. (Interaction Chirurgie x Traitement x Temps,  $F_{13,27}=1,37$ ,  $p=0,17$ ). A la fin des 15 jours de traitement et jusqu'au 50<sup>ème</sup> jour de test aucun effet de la duloxétine n'est observé (**figure 1C**).

3.2.2.2. Traitement tardif : l'injection de duloxétine (10 mg/kg) ou de solution saline 9‰ débute au 25<sup>ème</sup> et se termine au 40<sup>ème</sup> jour post-chirurgie. Le seuil de réponse de la patte postérieure droite des animaux du groupe cuff traités par la duloxétine montre une récupération au 9<sup>ème</sup> jour de traitement (Interaction Chirurgie x Traitement x Temps,  $F_{13,27}=5,33$ ,  $p<0,0001$  ; post-hoc : cuff duloxétine > cuff saline à  $p<0,0001$  du jour 34 à 42). Une rechute de l'allodynie neuropathique est ensuite

observée chez ces animaux 5 jours après l'arrêt du traitement, du jour 45 au jour 50 post-chirurgie (post-hoc : cuff duloxétine < sham à  $p < 0,0001$ ) (**figure 1D**).

### 3.2.3. Traitement par fluoxétine

3.2.3.1. Traitement précoce : l'injection de fluoxétine (10 mg/kg) ou de solution saline 9‰ commence 1 heure avant la chirurgie et se poursuit deux fois par jour pendant 15 jours pour les animaux cuff et les animaux sham. Le traitement par la solution saline ou la fluoxétine ne modifie pas le seuil de réponse des animaux. (Interaction Chirurgie x Traitement x Temps,  $F_{13,27}=0,70$ ,  $p=0,75$ ). A la fin des 15 jours de traitement et jusqu'au 50<sup>ème</sup> jour de test aucun effet de la fluoxétine n'est observé (**figure 1E**).

3.2.3.2. Traitement tardif : l'injection de fluoxétine (10 mg/kg) ou de solution saline 9‰ commence débute au 25<sup>ème</sup> et se termine au 40<sup>ème</sup> jour post-chirurgie. Le traitement par la solution saline ou la fluoxétine ne modifie pas le seuil de réponse des animaux. (Interaction Chirurgie x Traitement x Temps,  $F_{13,27}=0,59$ ,  $p=0,86$ ). A la fin des 15 jours de traitement et jusqu'au 50<sup>ème</sup> jour de test aucun effet de la fluoxétine n'est observé (**figure 1F**).

### 3.2.4. Traitement par la terbutaline

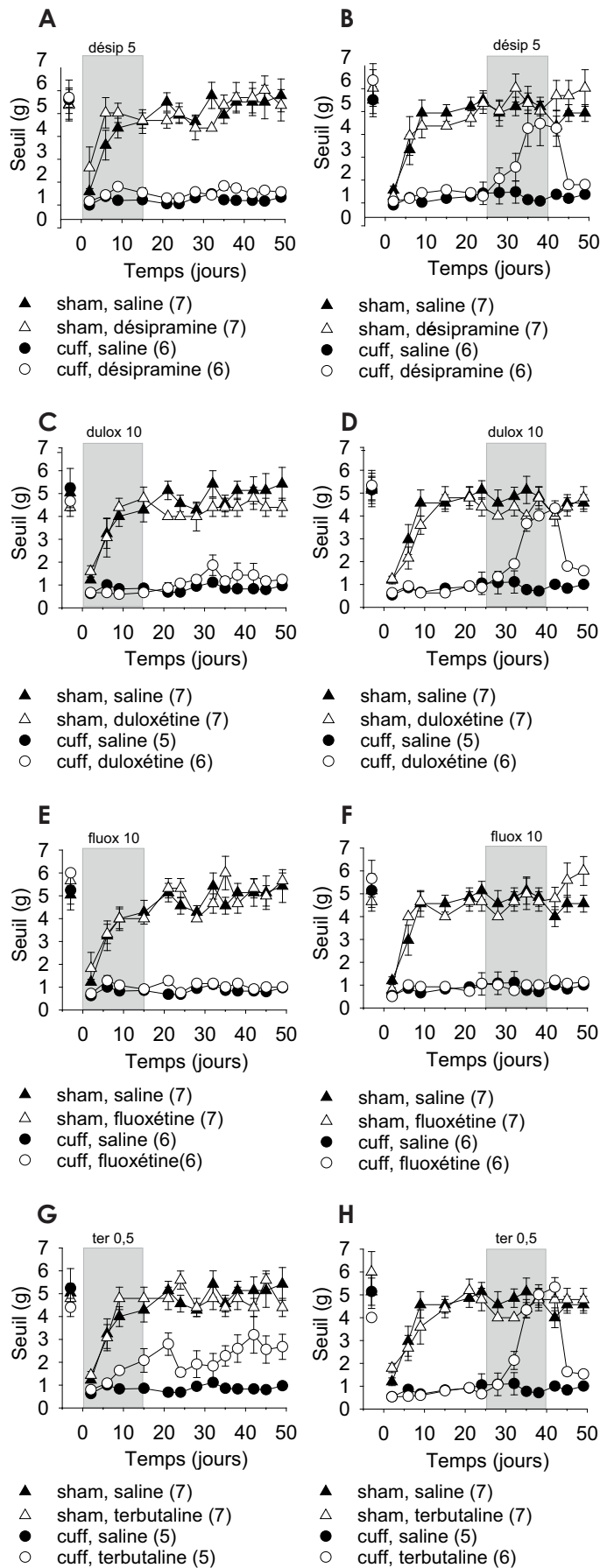
3.2.4.1. Traitement précoce : l'injection de terbutaline (0,5 mg/kg) ou de solution saline 9‰ commence 1 heure avant la chirurgie et se poursuit deux fois par jour pendant 15 jours pour les animaux cuff et les animaux sham. Le traitement par la terbutaline augmente sensiblement le seuil de sensibilité mécanique, de façon statistiquement non significative, sauf aux jours 21 et 42 à 50 (Interaction Chirurgie x Traitement x Temps,  $F_{13,26}=2,83$ ,  $p < 0,01$  ; post-hoc : cuff terbutaline > cuff saline à  $p < 0,01$ ), sans que les valeurs des niveaux de base soient retrouvées (post-hoc : cuff terbutaline < sham à  $p < 0,004$ ) (**figure 1G**).

3.2.4.2. Traitement tardif : l'injection de terbutaline (0,5 mg/kg) ou de solution saline 9‰ débute au 25<sup>ème</sup> et se termine au 40<sup>ème</sup> jour post-chirurgie. Le seuil de réponse de la patte postérieure droite des animaux du groupe cuff traités par la terbutaline montre une récupération au 9<sup>ème</sup> jour de traitement (Interaction Chirurgie x Traitement x Temps,  $F_{13,26}=7,33$ ,  $p < 0,0001$  ; post-hoc cuff terbutaline > cuff saline à  $p < 0,0001$  du jour 34 au jour 42). Une rechute de l'allodynie neuropathique est ensuite observée chez ces animaux du jour 45 au jour 50 post-chirurgie (post-hoc : cuff terbutaline < sham à  $p < 0,0001$ ) (**figure 1H**).

## 3.3. Groupe 2 : traitement par gabapentine ou carbamazépine

### 3.3.1. Traitement par gabapentine

3.3.1.1. Traitement précoce : l'injection de gabapentine (10 mg/kg) ou de solution saline 9‰ commence 1 heure avant la chirurgie et se poursuit deux fois par jour pendant 10 jours. A la fin des 10 jours de traitement, aucun effet direct de la gabapentine n'est observé. Par contre, à distance du traitement, le seuil de réponse des animaux du groupe cuff traités par gabapentine va remonter progressivement



## Figure 1. Traitements précoces et tardifs par antidépresseurs et terbutaline.

Le seuil de sensibilité est évalué avec des filaments de von Frey, les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les effectifs sont donnés entre parenthèses devant chaque groupe (n).

**(A)** Le traitement précoce par désipramine (désip 5 mg/kg, i.p.) 2 fois par jour pendant 15 jours ne modifie pas le seuil de sensibilité des animaux cuff. **(B)** Le traitement tardif par désipramine réduit l'allodynie installée mais une rechute est observée après l'arrêt du traitement des animaux cuff.

**(C)** Le traitement précoce par duloxétine (dulox 10 mg/kg, i.p.) 2 fois par jour pendant 15 jours ne modifie pas le seuil de sensibilité des animaux cuff. **(D)** Le traitement tardif par duloxétine réduit l'allodynie installée mais une rechute est observée après l'arrêt du traitement des animaux cuff.

**(E)** Le traitement précoce par fluoxétine (fluox 10 mg/kg, i.p.) 2 fois par jour pendant 15 jours ne modifie pas le seuil de sensibilité des animaux cuff. **(F)** Le traitement tardif par fluoxétine ne modifie pas le seuil de sensibilité des animaux cuff.

**(G)** Le traitement précoce par terbutaline (ter 0,5 mg/kg, i.p.) 2 fois par jour pendant 15 jours ne modifie que partiellement mais de façon durable le seuil de sensibilité des animaux cuff. **(H)** Le traitement tardif par terbutaline réduit l'allodynie installée mais une rechute est observée après l'arrêt du traitement des animaux cuff.

aux valeurs de base et s'y maintenir jusqu'au 59<sup>ème</sup> jour après la chirurgie (Interaction Chirurgie x Traitement x Temps,  $F_{14,35}=3,04$ ,  $p<0,0001$  ; post-hoc : cuff gabapentine > cuff saline à  $p<0,0001$  de J23 à J60). Aucun effet, même différé, de la gabapentine n'a été observé chez les animaux sham (**figure 2A**).

3.3.1.2. Traitement tardif : l'injection de gabapentine (10 mg/kg) ou de solution saline 9% débute au 25<sup>ème</sup> jour post-chirurgie. Au démarrage du traitement, les animaux du groupe cuff présentent une allodynie mécanique soutenue de la patte droite depuis la pose du manchon (Effet Chirurgie,  $F_{1,12}=109,57$ ,  $p<0,0001$ ), alors que dans le groupe sham les valeurs des seuils de réponse correspondent aux valeurs de base. Le traitement en deux injections quotidiennes est poursuivi pendant 10 jours. Le seuil de réponse de la patte postérieure droite des animaux du groupe cuff traités par la gabapentine récupère dès le 6<sup>ème</sup> jour de traitement (Interaction Chirurgie x Traitement x Temps,  $F_{14,29}=8,20$ ,  $p<0,0001$  ; post-hoc : cuff gabapentine > cuff saline à  $p<0,0001$  de J31 à J44). Une rechute de l'allodynie neuropathique est ensuite observée chez ces animaux 15 jours après l'arrêt du traitement (post-hoc : cuff gabapentine < sham à  $p<0,0001$ ). Le seuil de réponse des animaux du groupe cuff traités par solution saline 9% reste inchangé, l'allodynie installée se poursuivant 60 jours après la chirurgie. Le traitement par la gabapentine n'a aucun effet chez les animaux sham (**figure 2B**).

### 3.3.2. Traitement par la carbamazépine

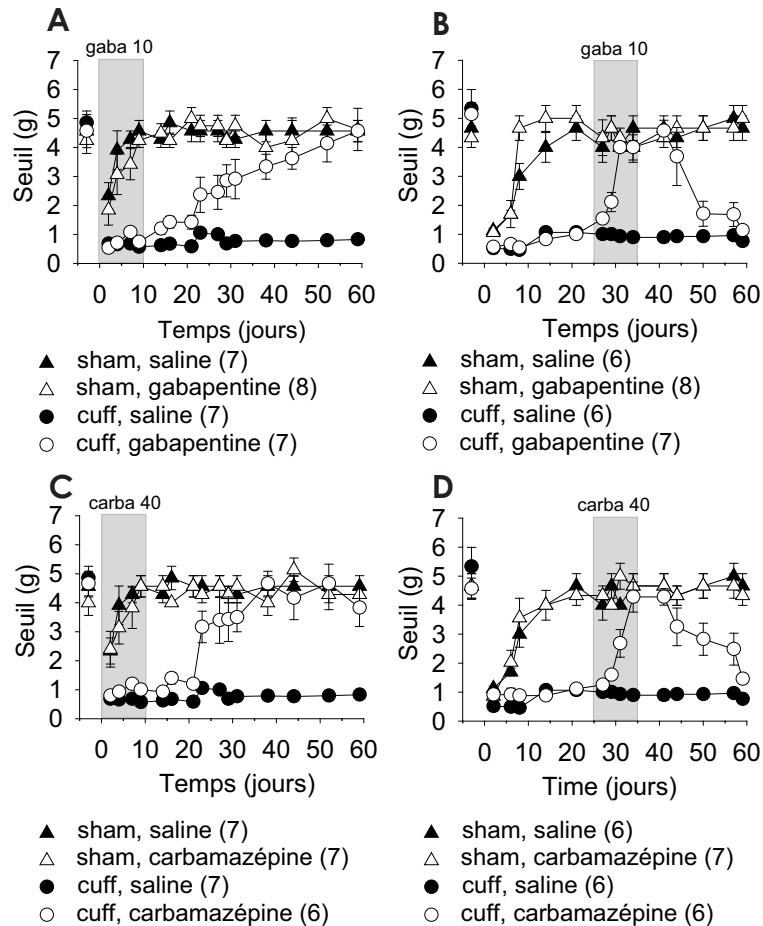
3.3.2.1. Traitement précoce : l'injection de carbamazépine (40 mg/kg) ou de solution saline 9% démarre 1 heure avant la chirurgie et se poursuit deux fois par jour pendant 10 jours. A l'issue des 10 jours de traitement, aucun effet bénéfique n'est observé. Par contre, en période post-traitement et à partir du 23<sup>ème</sup> jour, le seuil des animaux du groupe cuff traités par la carbamazépine remonte progressivement vers les valeurs de base jusqu'au 59<sup>ème</sup> jour après la chirurgie (Interaction Chirurgie x Traitement x Temps,  $F_{14,30}=5,53$ ,  $p<0,0001$  ; post-hoc : cuff carbamazépine > cuff saline à  $p<0,0001$  du jour 23 au jour 59) (**figure 2C**).

3.3.2.2. Traitement tardif : le traitement par injection de carbamazépine (40 mg/kg) ou de solution saline 9% débute au 25<sup>ème</sup> jour et est poursuivi en deux injections quotidiennes pendant 10 jours. Le seuil de réponse de la patte postérieure droite des animaux du groupe cuff traités par la carbamazépine est augmenté dès le 6<sup>ème</sup> jour de traitement (Interaction Chirurgie x Traitement x Temps,  $F_{14,29}=4,86$ ,  $p<0,00001$  ; post-hoc : cuff carbamazépine > cuff saline à  $p<0,05$  du jour 31 au jour 57 du traitement). Une rechute de l'allodynie neuropathique est ensuite observée le jour 59 post-chirurgie (post-hoc : cuff carbamazépine < sham à  $p<0,0001$ ) (**figure 2D**).

## 3.4. Groupe 3 : traitement par kétamine et dexa méthasone

### 3.4.1. Traitement par kétamine

3.4.1.1. Traitement précoce : l'injection de kétamine (15 mg/kg) ou de solution saline 9% démarre 1 heure avant la chirurgie et se poursuit deux fois par jour pendant 10 jours. A partir du 7<sup>ème</sup> jour, le seuil des animaux du groupe cuff traités par la kétamine reste significativement plus élevé jusqu'au 31<sup>ème</sup> jour après la chirurgie



**Figure 2. Traitements précoces et tardifs par gabapentine et carbamazépine.**

Le seuil de sensibilité est évalué avec des filaments de von Frey, les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. Les effectifs sont donnés entre parenthèses devant chaque groupe (n). **(A)** Le traitement précoce par gabapentine (gaba 10 mg/kg, s.c.) 2 fois par jour pendant 10 jours ne modifie pas le seuil de sensibilité des animaux cuff dans les premiers jours après la chirurgie. L'allodynie neuropathique disparaît à distance du traitement chez les animaux cuff traités par gabapentine. **(B)** Le traitement tardif par gabapentine réduit l'allodynie installée mais une rechute est observée après l'arrêt du traitement des animaux cuff.

**(C)** Le traitement précoce par carbamazépine (carba 40 mg/kg, s.c.) 2 fois par jour pendant 10 jours ne modifie pas le seuil de sensibilité des animaux cuff dans les premiers jours après la chirurgie. L'allodynie neuropathique disparaît à distance du traitement chez les animaux cuff traités par carbamazépine.

**(D)** Le traitement tardif par carbamazépine réduit l'allodynie installée mais une rechute est observée après l'arrêt du traitement des animaux cuff.



(Interaction Chirurgie x Traitement x Temps,  $F_{14,29}=1,90$ ,  $p<0,02$  ; post-hoc : cuff ké tamine > cuff saline à  $p<0,05$  au jour 7). Les seuils des animaux cuff traités par ké tamine vont progressivement reculer et rejoindre ceux des animaux traités par la solution saline au-delà du 44<sup>ème</sup> jour (**figure 3A**).

3.4.1.2. Traitement tardif : le traitement par injection de ké tamine (15 mg/kg) ou de solution saline 9‰ débute au 25<sup>ème</sup> jour et est poursuivi en deux injections quotidiennes pendant 10 jours. Le seuil de réponse de la patte postérieure droite des animaux du groupe cuff traités par la ké tamine est augmenté au 6<sup>ème</sup> jour de traitement (Interaction Chirurgie x Traitement x Temps,  $F_{14,28}=4,86$ ,  $p<0,001$ ; post-hoc : cuff ké tamine > cuff saline à  $p<0,02$  à J31). Une rechute de l'allodynie neuropathique est ensuite observée après l'arrêt du traitement (post-hoc : cuff ké tamine < sham à  $p<0,0001$  à J57) (**figure 3B**).

### 3.4.2. Traitement par dexaméthasone

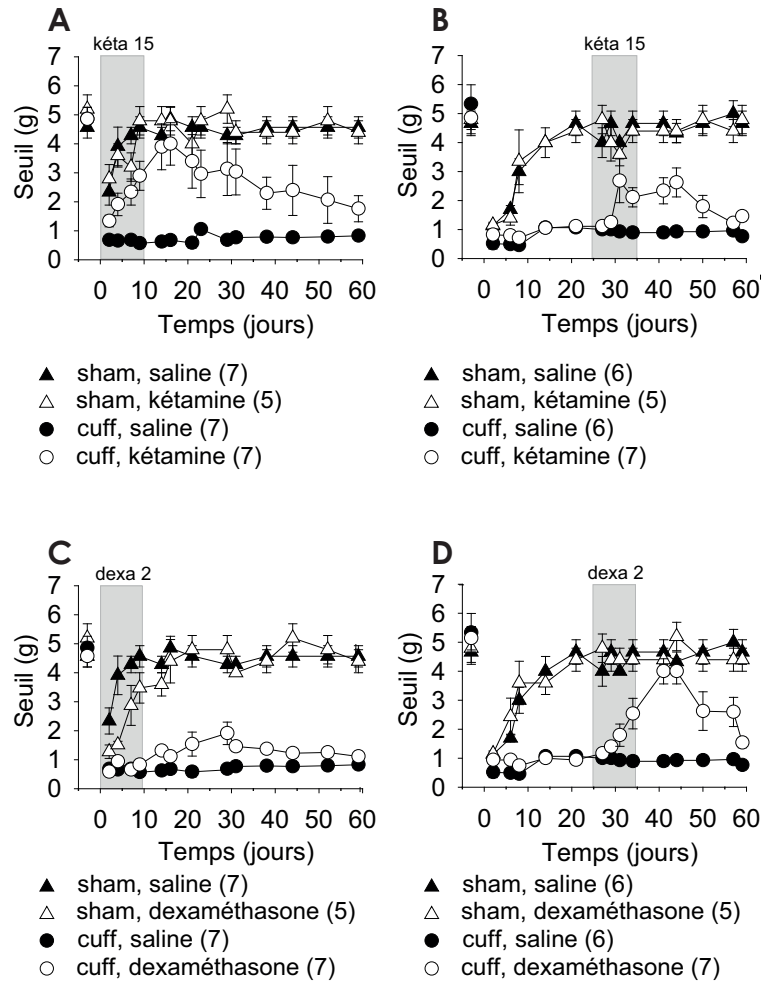
3.4.2.1. Traitement précoce : l'injection de dexaméthasone (2 mg/kg) ou de solution saline 9‰ démarre 1 heure avant la chirurgie et se poursuit une fois par jour pendant 10 jours. Le traitement par la solution saline ou la dexaméthasone ne modifie pas significativement le seuil de réponse des animaux. En fait, après l'arrêt du traitement, une tendance à la récupération est observée sur quelques jours de post-traitement (Interaction Chirurgie x Traitement x Temps,  $F_{13,28}=1,64$ ,  $p=0,07$  ; post-hoc : cuff dexaméthasone > cuff saline à  $p<0,04$  aux jours 29 et 31) mais ne dure pas (**figure 3C**).

3.4.2.2. Traitement tardif : le traitement par une injection quotidienne de dexaméthasone (2 mg/kg) ou de solution saline 9‰ débute au 25<sup>ème</sup> jour et est poursuivi pendant 10 jours. Le seuil de réponse de la patte postérieure droite des animaux du groupe cuff traités par la dexaméthasone va augmenter dès le 4<sup>ème</sup> jour de traitement (Interaction Chirurgie x Traitement x Temps,  $F_{14,28}=6,43$ ,  $p<0,0001$ ; post-hoc : cuff dexaméthasone > cuff saline à  $p<0,001$  du jour 29 au jour 50 post-chirurgie). Une rechute de l'allodynie neuropathique est ensuite observée (post-hoc : cuff dexaméthasone < sham à  $p<0,0001$  au jour 59) (**figure 3D**).

## 4. Discussion

Nos travaux montrent que des molécules comme la gabapentine, la carbamazépine et la terbuthaline administrées de façon précoce et soutenue n'empêchent pas la survenue d'une allodynie dans les jours qui suivent la pose du cuff. Par contre, chez ces animaux, l'allodynie mécanique statique va progressivement diminuer puis disparaître, partiellement ou totalement, à distance du traitement alors que les animaux cuff traités par solution saline restent allodyniques.

Dans notre modèle du cuff, ces travaux confirment que l'administration d'un traitement pendant 15 jours par un antidépresseur tricyclique comme la désipramine ou d'un IRSNA comme la duloxétine diminuent l'allodynie installée, comme le montre l'évaluation des seuils mécaniques par des filaments de von Frey. Comme



### Figure 3. Traitements précoces et tardifs par kétamine et dexaméthasone.

Le seuil de sensibilité est évalué avec des filaments de von Frey, les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les effectifs sont donnés entre parenthèses devant chaque groupe (n). **(A)** Le traitement précoce par kétamine (kéta 15 mg/kg, i.p.) 2 fois par jour pendant 10 jours modifie le seuil de sensibilité des animaux cuff dans les premiers jours après la chirurgie. L'allodynie neuropathique réapparaît au-delà du jour 44. **(B)** Le traitement tardif par kétamine réduit l'allodynie installée mais une rechute est observée après l'arrêt du traitement des animaux cuff. **(C)** Le traitement précoce par dexaméthasone (dexa 2 mg/kg, s.c.) 1 fois par jour pendant 10 jours ne modifie pas le seuil de sensibilité des animaux cuff, mais une tendance à la récupération est observée sur quelques jours de post-traitement. **(D)** Le traitement tardif par dexaméthasone réduit l'allodynie installée mais une rechute est observée après l'arrêt du traitement des animaux cuff.

cela a été démontré par notre équipe, cet effet passe par le biais des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques et un traitement par un  $\beta_2$ -agoniste comme la terbutaline va également avoir le même effet anti-allodynie dans ce modèle (Choucair-Jaafar et al., 2009; Yalcin et al., 2010; Bohren et al., 2013). Que le soulagement de l'allodynie soit obtenu par la désipramine, la duloxétine ou la terbutaline, on observe une rechute à l'arrêt du traitement, comme on peut l'observer en pratique clinique. Le traitement par un antidépresseur de type Inhibiteur de la Recapture Sélective de la Sérotonine (IRSS) n'a par contre aucun effet sur l'allodynie et le parallèle peut se faire avec la clinique où cette classe d'antidépresseurs n'a pas démontré son intérêt dans le traitement des douleurs neuropathiques (Attal et al., 2006). Quel que soit l'antidépresseur étudié ici, son administration précoce en phase préopératoire, soit un début 1 heure avant la chirurgie et pour une durée de 15 jours, n'empêche pas la survenue d'une allodynie chronique. Par contre, la terbutaline en traitement précoce semble diminuer partiellement l'allodynie chronique, en gardant toutefois un seuil inférieur à celui des animaux sham. Peu d'études cliniques récentes ont évalué la place des antidépresseurs dans la prévention des douleurs neuropathiques post-chirurgicales, la majorité d'entre-elles se focalisent sur des anti-hyperalgésiques comme les gabapentinoïdes ou la kétamine (Dahl and Kehlet, 2011). Une étude proposant un traitement de 10 jours par la venlafaxine, un antidépresseur IRSNA, démarré la veille d'une mastectomie montrait une diminution des douleurs post-mastectomie 6 mois après la chirurgie (Amr and Yousef, 2010). Cette étude étant conçue pour étudier la douleur post-opératoire aiguë, les résultats des critères secondaires restent à prendre avec prudence.

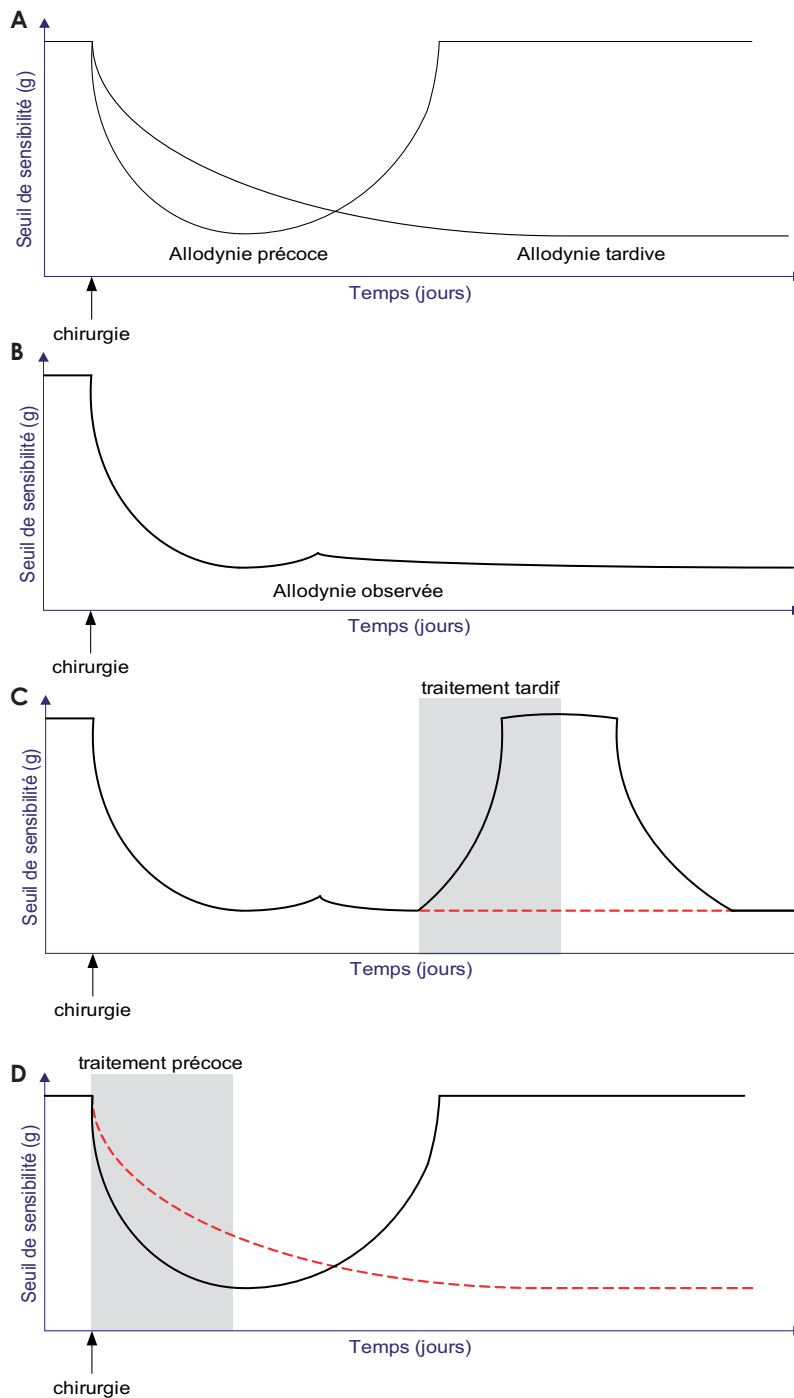
Notre choix des molécules antiépileptiques étudiées dans notre travail a été guidé par les recommandations de l'European Federation of Neurological Societies (EFNS). L'EFNS préconise la gabapentine ou la prégabaline (gabapentinoïdes) dans le traitement des douleurs neuropathiques ou la carbamazépine dans le cas des névralgies crâniennes (Attal et al., 2010). Dans notre modèle du cuff, un traitement par gabapentine ou carbamazépine permet effectivement de diminuer en quelques jours une allodynie installée, lorsque ce traitement est instauré tardivement. Mais comme lors d'un traitement par antidépresseurs ou par terbutaline, une rechute est observée après l'arrêt du traitement par gabapentine ou carbamazépine. Par contre, si ce traitement est démarré avant la chirurgie du cuff et se poursuit pendant 10 jours, il ne prévient pas l'apparition précoce d'une allodynie et il ne la soulage pas pendant la durée du traitement. Il n'y a donc pas d'effet, dans cette modalité, sur l'allodynie post-opératoire aiguë. Cependant, cette allodynie est résolutive en 3 semaines chez les souris ayant reçu la gabapentine ou la carbamazépine, alors qu'elle reste soutenue pendant plus de 60 jours chez des animaux traités par solution saline. L'effet thérapeutique est donc bien présent, mais différé dans le temps, suggérant le blocage ou l'inhibition des mécanismes de chronicisation. Suite à ces traitements précoces, aucune rechute n'est observée après soulagement de l'allodynie, que ce soit avec le traitement par gabapentine ou par carbamazépine. Contrairement à l'effet obtenu sur une allodynie installée, ces antiépileptiques instaurés en période préopératoire ont donc une action non seulement différée, mais également durable, qui pourrait suggérer que la mise en

place des mécanismes responsables de la chronicisation a été prévenue par le traitement.

Enfin, nous avons également testé 2 autres molécules en périodes préopératoire et post-opératoires tardives : la kétamine et la dexaméthasone. La kétamine est couramment utilisée en adjuvant de l'analgésie périopératoire et permet de diminuer la consommation en morphiniques en période aiguë. Ses propriétés d'antagonisme des récepteurs NMDA du glutamate en font un antihyperalgésique de choix (Weinbrum, 2012). Dans notre étude, le traitement par kétamine permet de diminuer l'allodynie, en période précoce comme en période tardive. Dans les 2 cas, l'effet sur l'allodynie va s'estomper progressivement après l'arrêt du traitement et ces résultats viennent confirmer l'effet connu de la kétamine sur l'allodynie post-opératoire aiguë (De Kock et al., 2001), mais ne nous permettent pas de conclure à un effet préventif sur les douleurs neuropathiques chroniques.

Sur la base de l'étude de Beaudry, nous avons choisi de tester la dexaméthasone (Beaudry et al., 2007). En effet, ce travail montrait une diminution de l'allodynie dans les 3 jours après la pose du cuff chez le rat grâce à une 1 injection unique 1 heure avant la chirurgie. Nous n'avons pas retrouvé cet effet dans notre modèle, puisqu'un traitement de 10 jours qui démarrait 1 heure avant la chirurgie n'a pas modifié les seuils d'allodynie. Par contre, un effet anti-allodynique transitoire est observé lors de l'administration de la dexaméthasone sur l'allodynie installée. Les propriétés anti-inflammatoires puissantes et l'effet de la dexaméthasone sur le système immunitaire permettait d'émettre l'hypothèse d'un effet préventif sur les mécanismes inflammatoires et neuro-immunitaires, périphériques comme médullaires. Notre protocole nous permet d'observer un effet antalgique mais pas d'effet prophylactique d'une administration précoce.

Les molécules qui ont montré un effet préventif sur la chronicisation de l'allodynie sont la gabapentine, la carbamazépine et dans une moindre mesure, la terbuthaline. Si ces 3 molécules ont en commun d'avoir bloqué la mise en place d'une allodynie chronique, elles ont pourtant chacune des cibles d'action principale distinctes. La gabapentine interagit avec les canaux calcium voltage-dépendants (Bauer et al., 2009), tandis que la carbamazépine bloque principalement les canaux sodium voltage-dépendants (Brau et al., 2001). La terbuthaline a un effet anti-allodynique qui passe par les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques (Bohren et al., 2013). Ces résultats suggèrent que plusieurs mécanismes concomitants existeraient dans notre modèle de neuropathie et participeraient à l'initiation et la persistance d'une allodynie. L'allodynie induite dans ce modèle est observée dès les premiers jours et ce jusqu'à 3 mois après la pose du cuff. Cette allodynie n'est probablement pas un phénomène unitaire mais la résultante de différents mécanismes. L'un d'eux pourrait être directement lié à la compression du nerf sciatique par le manchon, phénomène transitoire entraînant une allodynie immédiate mais potentiellement réversible en quelques jours à quelques semaines. Un autre mécanisme, responsable d'une allodynie à plus long terme et lié à des mécanismes de sensibilisation secondaire, se met en place de façon précoce mais n'apparaît que progressivement. Le traitement instauré en préopératoire n'aurait alors aucune action sur les premiers



**Figure 4. Décours temporel des phénomènes allodyniques.**

La chute du seuil de sensibilité mécanique après la chirurgie du cuff peut être le reflet de deux phénomènes allodyniques distincts (A) dont on observe la résultante (B). Un traitement tardif ne soulage que transitoirement l'allodynie installée (C). Un traitement préventif bloque l'apparition de l'allodynie tardive et chronique mais n'a pas d'effet sur l'allodynie précoce(D).

mécanismes responsables de l'allodynie observée les premiers jours, mais bloquerait la mise en place des mécanismes de chronicisation. Une fois ceux-ci enclenchés, les traitements antalgiques anti-neuropathiques n'ont plus sur l'allodynie qu'une action transitoire et réversible à leur arrêt (**figure 4**).

En conclusion, nos travaux soulignent l'intérêt d'étudier chez l'homme l'effet préventif sur les douleurs neuropathiques chroniques post-chirurgicales de l'administration précoce, et prolongée d'au moins 10 jours, d'un traitement par un antiépileptique comme la gabapentine ou la carbamazépine. L'impact d'un traitement préventif par  $\beta_2$ -agoniste reste à étudier.

## Ré sulta ts : c ha pitre III.

---

### Les doule urs neuropathiques du diabète

#### A. Introduction

##### 1. Aspe cts c liniques

Le diabète sucré est une pathologie chronique qui pose un problème crucial de santé publique dans nos sociétés occidentales. Des données épidémiologiques récentes montrent une prévalence de 8% de la population générale aux Etats-Unis (soit 25 millions de personnes) avec une incidence de 1,9 millions de nouveaux cas par an (Callaghan et al, 2012). 95% de ces patients souffrent de diabète de type 2, pathologie métabolique de l'adulte liée à une insulino-résistance, ce qui entraîne une importante production pancréatique d'insuline, jusqu'à épuisement. A l'inverse, le diabète de type 1 qui touche 5% des patients, est une maladie qui démarre chez l'enfant et l'adulte jeune et qui se caractérise par une perte de la sécrétion d'insuline liée à une destruction auto-immune des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans. Dans les deux cas, des neuropathies diabétiques consécutives à l'hyperglycémie en sont des complications fréquentes. Outre la polyneuropathie des extrémités et l'augmentation de la fréquence de neuropathies non spécifiques chez les patients diabétiques, des syndromes neuropathiques typiquement secondaires au diabète sont décrits. Des mono-neuropathies douloureuses peuvent toucher les membres inférieurs (curalgie diabétique) ou les nerfs oculomoteurs (III et IV). Une neuropathie douloureuse aiguë dite « insulinique » peut apparaître à la suite d'une correction brutale de l'hyperglycémie (Gibbons and Freeman, 2010). D'autres neuropathies compliquent le diabète, en particulier une atteinte du système nerveux végétatif, à l'origine de troubles cardiovasculaires, digestifs, urogénitaux et cutanés. Cette atteinte dysautonomique est source de surmortalité et de comorbidités par atteinte cardiaque chez les patients diabétiques (Bolton et al, 2005). Enfin, la neuropathie diabétique douloureuse la plus fréquente est la polyneuropathie distale des extrémités : elle touche 5 à 20% des patients diabétiques, plus fréquemment des diabétiques de type 2 (Van Acker et al, 2009) et sa prise en charge représente aux USA 1/3 des dépenses de santé liées au diabète (Gordois et al, 2003). Cliniquement, la polyneuropathie douloureuse liée au diabète comporte des sensations de brûlures ressenties au niveau des pieds puis des jambes, avec une topographie décrite « en

chaussette » (Marchettini et al, 2004). A cela se rajoute une hypoesthésie retrouvée à l'examen clinique avec un monofilament (sensibilité superficielle) et un diapason (sensibilité vibratoire). Des douleurs fulgurantes spontanées sont également reportées par les patients. Ces symptômes sont souvent majorés la nuit et la sensation de brûlure peut être exacerbée par le contact. Une extension progressive de ces troubles depuis les extrémités vers les régions proximales est observée et confirme une atteinte nerveuse longueur-dépendante.

La majorité des patients diabétiques développent au cours de leur vie des signes d'atteintes neuropathiques, mais pour une partie d'entre eux ces signes sont infra-cliniques : 50% des patients diabétiques ne présentent aucun signe clinique de neuropathie. La prévalence de la neuropathie diabétique est estimée à 7% des patients diabétiques depuis moins d'un an et 50% des diabétiques malades depuis plus de 20 ans (Young et al, 1993). Une étude épidémiologique récente réalisée en France montre que 1 patient diabétique sur 5 présente des douleurs neuropathiques chroniques, liées dans la plupart des cas à une polyneuropathie et avec un impact significatif sur leur qualité de vie (sommeil, anxiété, dépression). Seuls 38% de ces patients ont un traitement approprié pour les douleurs neuropathiques (Bohuassira et al, 2013).

## **2. Aspects physiopathologiques**

La physiopathologie de la polyneuropathie diabétique douloureuse est probablement multifactorielle, avec en facteur principal une hyperglycémie et une microangiopathie. L'excès de glucose entraîne, par la voie des polyols, une accumulation de sorbitol et de fructose intracellulaires. Cela a pour conséquence une augmentation de la pression osmotique intracellulaire, une réduction de l'activité de la  $Na^+/K^+$  ATPase impliquée dans les mouvements de sodium et la production de radicaux libres. L'ensemble de ces mécanismes a pour conséquence un stress oxydatif et l'induction d'une ischémie chronique par diminution des capacités de relaxation de la membrane vasculaire (Cameron et al, 2001; Oates, 2002; Chung and Chung, 2005). Une complication du diabète est une perturbation du métabolisme des acides gras essentiel. L'hyperglycémie et le stress oxydatif induit modifient la voie de transformation de l'acide linoléique et entraînent une



augmentation des thromboxanes (vasoconstrictrices et pro-aggrégantes plaquettaires) et une diminution des prostaglandines E2. Les conséquences en sont une réduction du flux sanguin et une hypoxie endoneurale (Cameron et al, 1998). Une autre voie sur laquelle l'hyperglycémie chronique a un impact délétère est celle de la glycosylation non-enzymatique des protéines. Parmi les complications, il est observé une élévation intracellulaire et extracellulaire de produits avancés de la glycation (Advanced Glycation End products ou AGE). La liaison des AGE à leurs récepteurs induit la production de cytokines comme de l'interleukine 1 ou du TNF- $\alpha$ . La liaison des AGE aux cellules endothéliales a pour conséquence une diminution de l'activité de la thrombomoduline, une activation des facteurs de coagulation et une production accrue de facteurs vasoconstricteurs comme l'endothéline (Brownlee, 1994; Tobin et al, 2008). Enfin, l'hyperglycémie a pour effet d'activer les protéines kinases C qui vont, via les mécanismes cités précédemment, modifier la réactivité vasculaire à l'oxyde nitrique et ainsi aggraver l'altération du flux sanguin local et l'hypoxie tissulaire (Qu et al, 1999; Inoguchi et al, 2003).

### **3. Modèles d'études**

Plusieurs modèles animaux de neuropathie diabétique périphérique ont été étudiés (Jaggi et al, 2011; Hoke, 2012; Islam, 2013). Les plus anciens et les plus utilisés sont les modèles de diabète chimio-induit : l'administration de molécules toxiques pour les cellules  $\beta$  pancréatiques supprime la production d'insuline et entraîne une hyperglycémie chronique. Les premiers modèles utilisaient l'administration d'alloxane (Preston, 1967) puis la streptozotocine (Jakobsen and Lundbaek, 1976) pour induire une neuropathie diabétique. Une injection unique sous-cutanée de streptozotocine permet d'observer l'apparition d'une hyperalgésie et d'une allodynie en 2 à 3 semaines chez le rat et en 4 semaines chez la souris (Ahlgren and Levine, 1993; Grover et al, 2000). Un modèle similaire mais avec une injection par voie intraveineuse permet d'observer des phénomènes neuropathiques similaires mais d'instauration plus rapide (Aley and Levine, 2001). Ces modèles, par la déplétion insulinaire qu'ils provoquent, présentent des similitudes avec les mécanismes observés chez l'homme dans le diabète de type 1. Ils reproduisent également d'autres phénomènes, comme de l'acidocétose et des troubles moteurs.

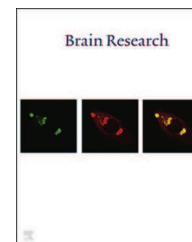
Les atteintes motrices de ces modèles pourraient être source d'erreurs d'interprétation des résultats dans les tests nociceptifs qui sollicitent la motilité des pattes par exemple (Brown et al., 1980; Moore et al., 1980). De plus, la durée des symptômes observés dans ces modèles n'est pas suffisamment prolongée pour tester des traitements à long terme.

Pour se rapprocher du mécanisme d'insulino-résistance du diabète de type 2, d'autres modèles ont été caractérisés. Ainsi, avec un régime riche en graisses, les souris développent une neuropathie périphérique en contexte « pré-diabétique » avec une allodynie mécanique (Obrosova et al., 2007). Enfin, sur le principe du contrôle de la masse grasse par la leptine, des modèles de souris avec une mutation du récepteur de la leptine (*db/db*) ou déficientes en leptine (*ob/ob*) ont été identifiées. Cette forme de résistance à la leptine explique des comportements d'hyperphagie et une sécrétion accrue d'insuline menant à une obésité et un diabète (Drel et al., 2006; Sullivan et al., 2007).

Sur ce modèle de souris obèses neuropathiques diabétiques *ob/ob*, nous avons participé aux travaux de notre laboratoire en étudiant l'effet de traitements par un antidépresseur et un  $\beta_2$ -agoniste sur l'allodynie mécanique. Pour ma part, j'ai réalisé des tests en injectant de la nortriptyline ou de la terbutaline en traitement chronique de l'allodynie d'origine diabétique et évalué cette allodynie avec des filaments de von Frey chez des souris *ob/ob* et leur contrôle *lean*. J'ai également effectué des tests de traitement aigu par naloxazine, un antagoniste des récepteurs mu des opioïdes, et par naltrindole, un antagoniste des récepteurs delta des opioïdes, dans une démarche d'exploration mécanistique de l'action de la nortriptyline et de la terbutaline. L'ensemble des résultats est décrit dans un article publié dans *Brain Research* en février 2014 sous le titre « The antiallodynic action of nortriptyline and terbutaline is mediated by  $\beta_2$  adrenoceptors and  $\delta$  opioid receptors in the *ob/ob* model of diabetic polyneuropathy » et qui est présenté à la suite de ces lignes (Choucair-Jaafar et al., 2014).

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

[www.elsevier.com/locate/brainres](http://www.elsevier.com/locate/brainres)

## Research Report

# The antiallodynic action of nortriptyline and terbutaline is mediated by $\beta_2$ adrenoceptors and $\delta$ opioid receptors in the *ob/ob* model of diabetic polyneuropathy



Nada Choucair-Jaafar<sup>a</sup>, Eric Salvat<sup>a,b</sup>, Marie-José Freund-Mercier<sup>a,c</sup>,  
Michel Barrot<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique, Strasbourg, France

<sup>b</sup>Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>c</sup>Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Accepted 12 December 2013

Available online 19 December 2013

## Keywords:

Antidepressant

 $\beta$  Adrenoceptors $\delta$  Opioid receptors

Diabetes

Neuropathic pain

Terbutaline

## ABSTRACT

Peripheral polyneuropathy is a frequent complication of diabetes. One of its consequences is neuropathic pain which is often chronic and difficult to treat. This pain management classically involves anticonvulsant drugs or tricyclic antidepressant drugs (TCA). We have previously shown that  $\beta_2$  adrenoceptors and  $\delta$  opioid receptors are critical for TCA action in a traumatic model of neuropathic pain. In the present work, we used the obese leptin deficient mice (*ob/ob*) which are a genetic model of type 2 diabetes in order to study the treatment of diabetic polyneuropathy. *ob/ob* mice with hyperglycemia develop tactile bilateral allodynia. We investigated the action of the TCA nortriptyline and the  $\beta_2$  adrenoceptor agonist terbutaline on this neuropathic allodynia. The consequences of acute and chronic treatments were tested, and mechanical allodynia was assessed by using von Frey hairs. Chronic but not acute treatment with nortriptyline alleviates allodynia caused by the diabetic neuropathy. This effect depends on  $\beta_2$  adrenoceptors but not on  $\alpha_2$  adrenoceptors, as shown by the blockade with repeated co-administration of the  $\beta_2$  adrenoceptor antagonist ICI118551 but not with repeated co-administration of the  $\alpha_2$  adrenoceptor antagonist yohimbine. Direct stimulation of  $\beta_2$  adrenoceptors appears sufficient to relieve allodynia, as shown with chronic terbutaline treatment.  $\delta$  but not  $\mu$  opioid receptors seem important to these action since acute naltrindole, but not acute naloxonazine, reverses the effect of chronic nortriptyline or terbutaline treatment.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

\*Corresponding author at: Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, 21 rue Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France.  
Fax: +33 388 613 347.

E-mail address: [mbarrot@inci-cnrs.unistra.fr](mailto:mbarrot@inci-cnrs.unistra.fr) (M. Barrot).

## 1. Introduction

Neuropathic pain is a possible consequence of diabetes mellitus, a chronic disease marked by elevated blood sugar levels. The incidence of diabetes among the population is increasing and neuropathy is a frequent complication of this disease (Vincent and Feldman, 2004). Though it may result in focal or multifocal neuropathies, it more often leads to generalized symmetric polyneuropathies, first affecting limb extremities with symptoms ascending from the toes to foot and gradually to the knee as the neuropathy progresses (Guastella and Mick, 2009). The symptoms may include spontaneous sensations of burning in the legs, evoked allodynia (pain in response to a non-nociceptive stimulus) and hyperalgesia (increased pain response). Numbness and tingling are also frequent sensory symptoms. Tricyclic antidepressants (TCA) are among first-line treatments for painful diabetic polyneuropathy (Attal et al., 2010; Dworkin et al., 2010; Saarto and Wiffen, 2010), and mainly target the transporters of noradrenaline and serotonin. The present study addresses their mechanism of action in the context of diabetes.

Various murine models are used in the study of neuropathic pain related to diabetes (Jaggi et al., 2011). Obesity is the primary risk factor for developing type 2 diabetes (Ross et al., 2011), and it may be studied using the obese *ob/ob* mice. The *ob* mutation is recessive and affects the *leptin* gene, coding for a 16 kDa hormone mainly secreted by fat cells into the bloodstream and involved in the control of food intake and energy expenditure. *Ob/ob* mice are used in the study of obesity (Drel et al., 2006; Koenen et al., 2011; Lindström, 2007; Nakarai et al., 2012), diabetic nephropathy (Allen et al., 2004; Alpers and Hudkins, 2011; Hudkins et al., 2010) and cardiomyopathy (Lindström, 2007; Van der Mieren et al., 2012). These mice have also been proposed as an interesting model for neuropathy related to type 2 diabetes (Drel et al., 2006; Lee et al., 2008; Nowicki et al., 2012; Vareniuk et al., 2007).

*Ob/ob* mice display mild chronic hyperglycemia and obesity. At adulthood, they develop deficits in motor nerve conduction velocity and hind-limb digital sensory nerve conduction velocity (Drel et al., 2006; Vareniuk et al., 2007), as well as tactile allodynia (Drel et al., 2006; Kou et al., 2013; Latham et al., 2009; Vareniuk et al., 2007), either heat hyperalgesia (Latham et al., 2009; Orestes et al., 2013) or heat hypoalgesia (Drel et al., 2006; Rodgers et al., 2014; Vareniuk et al., 2007), decreased myelin sheath thickness in sciatic nerve large fibers (Nowicki et al., 2012) and a loss of intraepidermal nerve fibers (Drel et al., 2006; Vareniuk et al., 2007). In the present study, we more specifically evaluated the treatment of tactile allodynia by testing the animals with von Frey filaments.

Using a murine model of peripheral nerve injury induced by sciatic nerve cuffing (Benbouzid et al., 2008c), we previously studied the role of adrenoceptors in the antiallodynic action of antidepressant drugs. We observed that neither  $\alpha_2$ , nor  $\beta_1$  or  $\beta_3$  adrenoceptors were implicated in this antiallodynic effect which appears to be mediated through noradrenaline recruitment of  $\beta_2$  adrenoceptors (Barrot et al., 2010; Bohren et al., 2013; Yalcin et al., 2009a, 2009b). Accordingly,

it also appeared that agonists of  $\beta_2$  adrenoceptors suppressed the neuropathic allodynia following nerve compression (Barrot et al., 2009; Choucair-Jaafar et al., 2009, 2011; Yalcin et al., 2010). Supporting these preclinical data, a case report revealed that salbutamol provided satisfactory symptom management in patients with neuropathic pain (Cok et al., 2010). In the present study we assessed whether the antiallodynic action of the TCA nortriptyline also involved  $\beta_2$  adrenoceptors in the context of painful diabetic neuropathy, and tested the action of an agonist of  $\beta_2$  adrenoceptors.

The opioid system and opioid receptors have been implicated in the antiallodynic action of antidepressants (Marchand et al., 2003; Micó et al., 2006). Using a model of peripheral nerve injury and combining pharmacological and genetic approaches, we previously observed that the antiallodynic effect of chronic treatment with the TCA nortriptyline required  $\delta$  opioid receptors (Benbouzid et al., 2008a, 2008b) but not  $\mu$  opioid receptors (Bohren et al., 2010). Similarly to antidepressant drug action, the antiallodynic action of a  $\beta$  adrenoceptor agonist in a model of nerve constriction also required the  $\delta$  opioid receptors (Yalcin et al., 2010). In the present study, we thus assessed whether opioid receptors are likewise necessary for the relief of allodynia in diabetic mice.

Using *ob/ob* mice, we show that the TCA nortriptyline reverses the mechanical allodynia associated with the diabetic polyneuropathy, and that this effect is blocked by a co-treatment with the  $\beta_2$  adrenoceptor antagonist ICI118551 but not with the  $\alpha_2$  adrenoceptor antagonist yohimbine. We also observed that a direct stimulation of  $\beta_2$  adrenoceptors with terbutaline is sufficient to induce a recovery from allodynia. Finally, we show that  $\delta$  opioid receptors but not  $\mu$  opioid receptors are implicated in the antiallodynic action of both the TCA and the  $\beta_2$  adrenoceptor agonist.

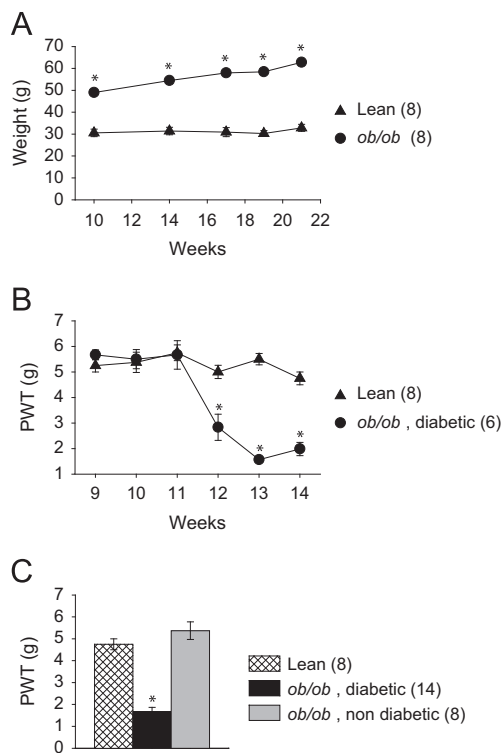
## 2. Results

### 2.1. Type 2 diabetes-related neuropathy in *ob/ob* mice

All *ob/ob* mice become overweight (Fig. 1A) but at 8 weeks of age, 28% of the tested mice had not developed obesity-related diabetes, as revealed by their lack of chronic hyperglycemia ( $<1.5 \text{ g.L}^{-1}$ ). Diabetic mice had a mean glycemia level of  $2.35 \pm 0.13 \text{ g.L}^{-1}$ , while it was of  $1.3 \pm 0.36 \text{ g.L}^{-1}$  and  $1.1 \pm 0.37 \text{ g.L}^{-1}$  for Lean animals and non-diabetic *ob/ob* mice respectively. Diabetic *ob/ob* mice developed mechanical allodynia with time (Group  $\times$  Time interaction,  $F_{3,48} = 14.18$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 1B), while no allodynia was present in non-diabetic *ob/ob* mice ( $F_{2,27} = 37.96$ ,  $p < 0.001$ ; post-hoc: *ob/ob* diabetic  $<$  Lean at  $p < 0.001$ ) (Fig. 1C). After determination of diabetes and of allodynia, the Lean mice and the diabetic *ob/ob* mice were assigned to the different treatment groups.

### 2.2. Nortriptyline treatment of allodynia in *ob/ob* mice

Acute nortriptyline administration had no effect on neuropathic allodynia (Fig. 2A). However, repeated nortriptyline treatment suppressed allodynia after 10 days (Group  $\times$  Time interaction,  $F_{18,126} = 3.79$ ,  $p < 0.0001$ ; post-hoc: *ob/ob*Nor  $>$  *ob/ob*Sal at  $p < 0.05$  on treatment days 10 to 13) (Fig. 2B). To test whether this



**Fig. 1 – Obesity and mechanical allodynia in diabetic *ob/ob* mice. (A) Weight increase in *ob/ob* mice and their Lean controls from 9 to 22 weeks of age. (B) Diabetic *ob/ob* mice developed mechanical allodynia starting from 12 weeks of age. (C) Paw withdrawal thresholds (PWT) in Lean, *ob/ob* diabetic and *ob/ob* non diabetic mice at 14 weeks of age. Data are represented as mean  $\pm$  SEM, n are given between brackets, \*:  $p < 0.05$  for *ob/ob* mice compared to Lean mice.**

antiallodynic action of nortriptyline was dependent upon  $\beta_2$  adrenoceptors, a group of mice treated with nortriptyline for 2 weeks was co-treated with the selective  $\beta_2$  adrenoceptor antagonist ICI118551 over several days while another group remained under the nortriptyline treatment (Fig. 2C). The co-treatment suppressed the antiallodynic action of nortriptyline (Group  $\times$  Time interaction,  $F_{9,69} = 6.79$ ,  $p < 0.0001$ ; post-hoc: *ob/ob*NorICI118551 < Lean at  $p < 0.01$  from day 3 of co-treatment). This relapse was not related to an intrinsic pro-allodynic action of ICI118551. Indeed, ICI118551 administered alone for 5 days had no effect *per se* on Lean mice or on *ob/ob* mice (Fig. 2D). While  $\beta_2$  adrenoceptors appeared important in the antiallodynic action of nortriptyline, this was not the case for  $\alpha_2$  adrenoceptors as the co-administration of the  $\alpha_2$  adrenoceptor antagonist yohimbine failed to induce a relapse of allodynia (Fig. 2E).

### 2.3. Terbutaline treatment of allodynia in *ob/ob* mice

We also examined the effect of terbutaline treatment in separate sets of mice. Acute injection of this  $\beta_2$  adrenoceptor agonist had no effect on nociceptive thresholds (Fig. 3A), while repeated treatment led to relief of allodynia after 11 days (Group  $\times$  Time interaction,  $F_{18,138} = 4.31$ ,  $p < 0.0001$ ; post-hoc: *ob/ob*Ter > *ob/ob*Sal at  $p < 0.05$  on treatment days 11–21) (Fig. 3B).  $\beta_2$  adrenoceptor selectivity of this effect was then

controlled by co-administration of ICI118551. After 3 weeks of terbutaline treatment, co-treatment with ICI118551 reversed the antiallodynic action of terbutaline (Group  $\times$  Time interaction,  $F_{9,75} = 8.29$ ,  $p < 0.0001$ ; post-hoc: *ob/ob*TerICI118551 < Lean at  $p < 0.01$  from day 3 of co-treatment) (Fig. 3C).

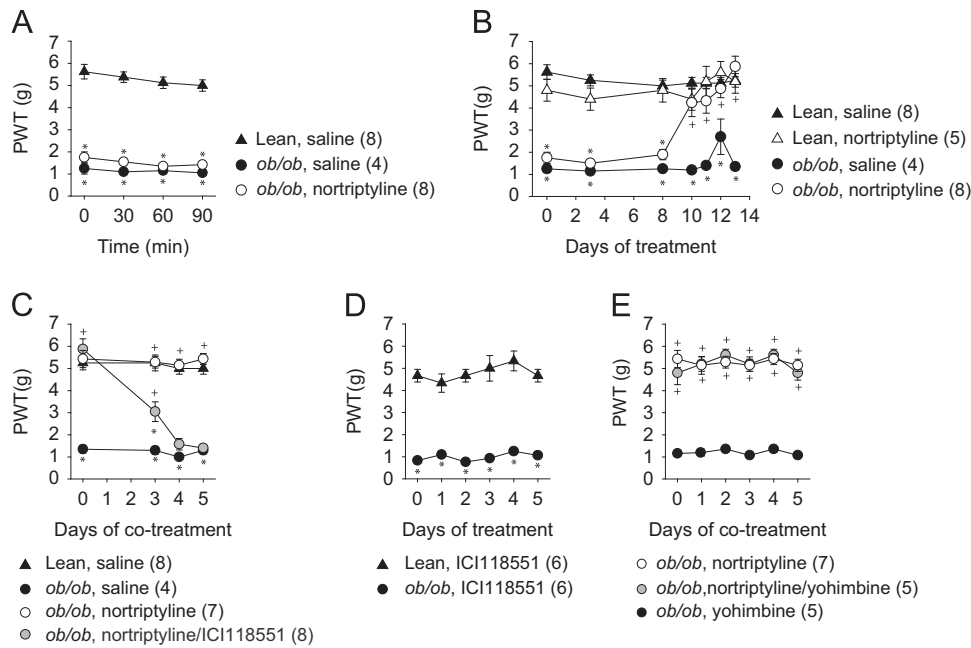
### 2.4. $\delta$ Opioid receptors are involved in nortriptyline and terbutaline antiallodynic effect

Acute saline injection did not affect paw withdrawal threshold (Fig. 4). In *ob/ob* mice relieved from allodynia by chronic nortriptyline or terbutaline treatments, the acute administration of the  $\delta$  opioid receptor antagonist naltrindole (5 mg.  $\text{kg}^{-1}$ ) induced a rapid (within 30 min) relapse of allodynia (Group  $\times$  Time interaction,  $F_{3,25} = 31.12$ ,  $p < 0.0001$ ; post-hoc for *ob/ob*Nor mice and for *ob/ob*Ter mice: Pre-test < Post-test at  $p < 0.0001$  with naltrindole) (Fig. 4). This relapse was observed while, in control animals, naltrindole had no effect *per se*. Although  $\delta$  opioid receptors appeared important to the antiallodynic action of nortriptyline and terbutaline, this was not the case for  $\mu$  opioid receptors. Indeed, the acute administration of the  $\mu$  opioid receptor antagonist naloxonazine (30 mg.  $\text{kg}^{-1}$ ) failed to induce allodynia relapse (Fig. 4).

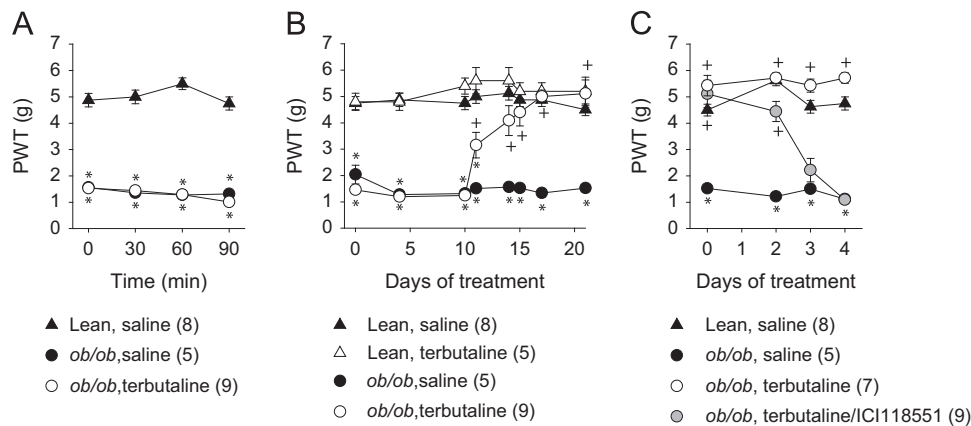
## 3. Discussion

In this study, we show that treatment with a TCA or a  $\beta_2$  adrenoceptor agonist relieves type 2 diabetes-related neuropathic allodynia in obese *ob/ob* mice. With both treatments, this antiallodynic action is reversed by co-administration of the  $\beta_2$  adrenoceptor antagonist ICI118551, but not by the  $\alpha_2$  adrenoceptor antagonist yohimbine. The antiallodynic action also presents a selective opioidergic component, since an acute injection of the  $\delta$  opioid receptor antagonist naltrindole (but not of the  $\mu$  opioid receptor antagonist naloxonazine) induces relapse of allodynia in nortriptyline-treated and in terbutaline-treated *ob/ob* mice. This genetic and physiologically relevant model of type 2 diabetes is thus also of interest in the study of treatments of painful diabetic neuropathy, our data supporting a common therapeutic mechanism between relief of nerve injury-induced and of diabetic polyneuropathy-induced allodynia by TCA.

Various rodent models permit the study of diabetic polyneuropathy (Jaggi et al., 2011). Cytotoxic glucose analogs such as streptozotocin or alloxan are often used to induce type 1 diabetes (Rees and Alcolado, 2005). These toxins enter cells through the GLUT2 glucose transporter expressed by pancreatic  $\beta$  cells (Lenzen, 2008), but also target other organs whose cells express this transporter, including kidney and liver. Genetic animal models of type 1 diabetes, resulting from inbreeding of selected rodents, are also available both in mice and rats (Jaggi et al., 2011; Rees and Alcolado, 2005). Current rodent models of polyneuropathy related to type 2 diabetes rely on genetic selection and have the interest of reproducing a risk factor. All *ob/ob* mice, defective for *leptin*, become overweight. As expected with a “physiological” model of predisposition, not all develop diabetes and its nociceptive polyneuropathy-induced consequences. The mechanical allodynia we observed



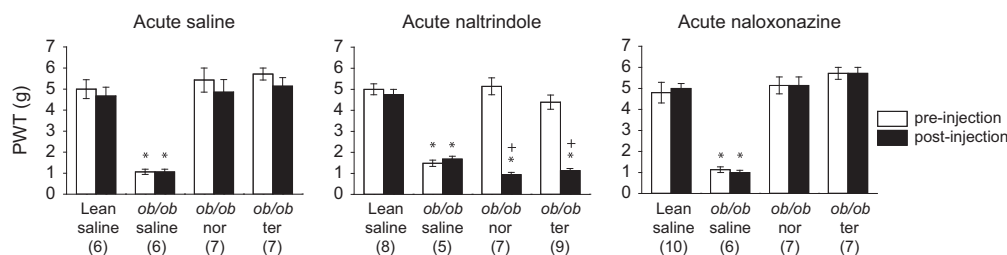
**Fig. 2 – Nortriptyline treatment of mechanical allodynia in *ob/ob* mice. (A) Acute nortriptyline administration (5 mg.kg<sup>-1</sup>, i.p.) did not affect the paw withdrawal threshold (PWT) of *ob/ob* neuropathic mice. (B) Chronic nortriptyline treatment (5 mg.kg<sup>-1</sup>, i.p., twice a day) reversed the mechanical allodynia in *ob/ob* mice. (C) Repeated co-administration of the  $\beta_2$  adrenoceptor antagonist ICI118551 reversed the antiallodynic effect of chronic nortriptyline treatment. (D) Repeated administration of ICI118551 had no effect *per se* in Lean mice and in *ob/ob* mice. (E) Repeated co-administration of the  $\alpha_2$  adrenoceptor antagonist yohimbine did not reverse the antiallodynic effect of chronic nortriptyline treatment. Data are represented as mean  $\pm$  SEM, n are given between brackets, \*:  $p < 0.05$  for *ob/ob* mice compared to Lean controls, +:  $p < 0.05$  for *ob/ob* mice compared to *ob/ob* saline.**



**Fig. 3 – Terbutaline treatment of mechanical allodynia in *ob/ob* mice. (A) Acute terbutaline administration (0.5 mg.kg<sup>-1</sup>, i.p.) did not affect the paw withdrawal threshold (PWT) of *ob/ob* neuropathic mice. (B) Chronic terbutaline treatment (0.5 mg.kg<sup>-1</sup>, i.p., twice a day) reversed the mechanical allodynia in *ob/ob* mice. (C) Repeated co-administration of the  $\beta_2$  adrenoceptor antagonist ICI118551 reversed the antiallodynic effect of chronic terbutaline treatment. Data are represented as mean  $\pm$  SEM, n are given between brackets, \*:  $p < 0.05$  for *ob/ob* mice compared to Lean controls, +:  $p < 0.05$  for *ob/ob* mice compared to *ob/ob* saline.**

after 12 weeks is in agreement with previous reports with this model (Drel et al., 2006; Vareniuk et al., 2007), and we show in the present study that this allodynia is sensitive to chronic treatment with a TCA. *Ob/ob* mice are thus not only relevant for the study of diabetic painful polyneuropathy but they are also of interest for the study of its treatment. Unfortunately, the widespread use of this model remains limited by the high cost of *ob/ob* mice, which is a consequence of breeding difficulties.

TCA are among the first-line treatments of neuropathic pain, including neuropathic pain arising as a consequence of diabetic polyneuropathy (Attal et al., 2010; Dworkin et al., 2010; Saarto and Wiffen, 2010). These drugs mainly act by blocking the transporters of noradrenaline and serotonin. The critical role of the noradrenergic component in neuropathic pain relief was first suggested by the poor clinical effectiveness of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI)



**Fig. 4 – Opioid receptors and nortriptyline and terbutaline action.** An acute administration of naltrindole ( $5 \text{ mg.kg}^{-1}$ , s.c., center graph) suppressed the antiallodynic effect of chronic nortriptyline (nor,  $5 \text{ mg.kg}^{-1}$ , i.p., twice a day) or terbutaline (ter,  $0.5 \text{ mg.kg}^{-1}$ , i.p., twice a day) treatments. The acute administration of a saline solution ( $0.9\% \text{ NaCl}$ , s.c., left graph) or of a naloxonazine solution ( $30 \text{ mg.kg}^{-1}$ , s.c., right graph) did not affect paw withdrawal thresholds (PWT). Mice were tested before (pre-test) and 30 min after (post-test) the acute injection. Data are represented as mean  $\pm$  SEM, *n* are given between brackets, \*:  $p < 0.05$  compared to Lean controls, +:  $p < 0.05$  compared to pre-injection.

(Attal et al., 2010; Dworkin et al., 2010; Max et al., 1992; Saarto and Wiffen, 2010). The lack of SSRI action can also be observed preclinically in a rodent model of nerve compression (Benbouzid et al., 2008a). This raised the question of the role of the adrenoceptor(s) in mediating the action of TCA-induced noradrenaline. In a peripheral nerve compression model, the critical role of  $\beta_2$  adrenoceptors, but not of  $\alpha_2$  adrenoceptors, has been shown for the TCA nortriptyline (Yalcin et al., 2009a) and generalized to the antiallodynic action of other antidepressant drugs (Yalcin et al., 2009b) such as desipramine and venlafaxine. In each case, an antagonist of  $\beta_2$  adrenoceptors reversed the antiallodynic action of the antidepressant drugs, and this antiallodynic action was simply absent in  $\beta_2$  adrenoceptor-deficient mice (Yalcin et al., 2009a, 2009b). The present data demonstrate that the  $\beta_2$  adrenoceptor antagonist ICI118551 also reverses the relief of allodynia by nortriptyline in *ob/ob* mice. The recruitment of these adrenoceptors thus appears to be a general mechanism which applies to allodynia relief in the context of both nerve injury and diabetic polyneuropathy.

Beside the noradrenergic system, the TCAs also target the serotonin and cholinergic systems as well as NMDA and histamine receptors and sodium channels such as the Nav1.7. Some of these other targets may also participate in the allodynia relieving action of TCAs (Dick et al., 2007; Kalezić et al., 2013; Micó et al., 2006), which will require further investigation. Another important finding is the delayed onset of the antiallodynic effect. While this delay is in agreement with the clinical therapeutic onset, its mechanism is still to elucidate. In the field of depression treatment, the onset delay has been proposed to be related to long-term molecular and neural plasticity (Nestler et al., 2002; Tsankova et al., 2007) and similar plasticity may also be necessary for TCA action against pain. For example, we recently observed that antidepressants indirectly inhibit TNF $\alpha$  overexpression through a  $\beta_2$  adrenoceptor-mediated mechanism (Bohren et al., 2013). This actively participates in the antidepressants' antiallodynic action, but the complete cascade of events is likely to include other steps.

Based on experimental evidences pointing at a role of  $\beta_2$  adrenoceptors in the antiallodynic action of antidepressant drugs, agonists of these receptors were first tested in a murine model of sciatic nerve compression where they

relieved neuropathic allodynia after sustained treatment (Choucair-Jaafar et al., 2009; Yalcin et al., 2010). Interestingly, the present data show that the  $\beta_2$  adrenoceptor agonist terbutaline also displays an antiallodynic action in the context of diabetic polyneuropathy. As is the case for nerve injury, we found that this action requires at least 10 days of treatment. Moreover, we observed that the action of both nortriptyline and terbutaline were affected by the blockade of  $\delta$  opioid receptors but not of  $\mu$  opioid receptors, which is similar to what is observed after sciatic nerve compression (Benbouzid et al., 2008a, 2008b; Bohren et al., 2010; Yalcin et al., 2010). These results thus support a common antiallodynic mechanism shared by antidepressant drugs and  $\beta_2$  adrenoceptor agonists in these different aetiologies of peripheral neuropathy.

While both the  $\beta_2$  adrenoceptors and the  $\delta$  opioid receptors are important for the antiallodynic action of TCAs (Benbouzid et al., 2008a, 2008b; Yalcin et al., 2009a, 2009b; present results) and of agonists of  $\beta_2$  adrenoceptors (Yalcin et al., 2010; present results), the mechanistic link between these receptors is still unclear. Interestingly, the involvement of both receptors has also been observed in sympathetic-related analgesia in inflammatory pain (Binder et al., 2004), and in the antiallodynic action of curcumin (Zhao et al., 2012). In the heart, it has been shown that  $\delta$  opioid receptors expressed by intrinsic cardiac adrenergic cells initiate heart protection through the adrenergic recruitment of  $\beta_2$  adrenoceptors (Huang et al., 2007, 2009; Nguyen et al., 2012). However, the cascade of events underlying the antiallodynic mechanism may differ. Indeed, the delayed antiallodynic action associated with  $\beta_2$  adrenoceptors and the acute relapse after administration of naltrindole suggest that the opioid component is more likely downstream of the adrenergic one. In transfected cell cultures, heteromeric complexes of  $\delta$  opioid receptors and  $\beta_2$  adrenoceptors have been observed (Cao et al., 2005; Jordan et al., 2001; Ramsay et al., 2002). However, there is as yet no evidence that both receptors may be co-expressed by the same cells within the nociceptive system, or that such oligomeric complexes may be formed by native receptors. Understanding the antiallodynic link between both receptors will thus require further research.

Clinically,  $\beta_2$  adrenoceptor agonists have not yet been tested against neuropathic pain in a double-blind placebo-controlled

protocol, but a case report on 6 patients is supportive of the therapeutic potential (Cok et al., 2010) and should promote clinical trials. The relation between  $\beta$  adrenoceptors and pain is complex and it likely depends on the subtype of receptor and on the subtype of pain that is considered. Agonists of the  $\beta_3$  adrenoceptors expressed in the gut and bladder have thus been proposed as potential therapies for visceral functional and inflammatory disorders, such as irritable bowel syndrome (Kelleher et al., 2008; Ursino et al., 2009). In the context of musculoskeletal pain disorders, a predominant influence of  $\beta_2$  adrenoceptors has been genetically demonstrated by links between haplotype polymorphisms of these receptors and the risk to develop temporo-mandibular disorders (Diatchenko et al., 2006), the incidence of fibromyalgia (Vargas-Alarcón et al., 2009), and more generally the predisposition to chronic pain (Hocking et al., 2010). In patients with fibromyalgia or temporo-mandibular disorder, the  $\beta$  adrenoceptor antagonist propranolol can reduce pain intensity (Light et al., 2009), but different responses to propranolol can be observed depending on the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene polymorphism (Tchivileva et al., 2010), suggesting that COMT haplotypes may be used as a genetic predictor of the treatment outcome with  $\beta$  antagonist. These data indicate that the impact of  $\beta$  adrenoceptor manipulation may strongly differ in the contexts of musculoskeletal pain and of neuropathic pain for which agonists may be beneficial.

Clinical studies concerning the use of  $\beta_2$  adrenoceptor agonists in diabetic patients focus principally on the control of glycemia. Most studies, using systemic routes of administration of the  $\beta_2$  adrenoceptor agonist, show an increase in blood glucose in normal subjects and in patients with diabetes (Gündogdu et al., 1979; Smith et al., 1984; Torella et al., 1980; Wiethop and Cryer, 1993a). Indeed, adrenaline and noradrenaline act on the liver via the  $\beta_2$  adrenoceptors to increase hepatic glycogenolysis and release of glucose into the circulation (Exton, 1987). Thus, agonists of  $\beta_2$  adrenoceptors may be potentially useful for the treatment of iatrogenic hypoglycemia in insulin-dependent diabetes (Wiethop and Cryer, 1993b). However, when the adrenergic agents are administered by inhalation, the effect on blood glucose is unclear and often not significant (Bateman et al., 1978; König et al., 2005). A recent study showed a higher prevalence of asthma among youth with type 2 diabetes (16.1%) compared to type 1 diabetes (10.0%) (Black et al., 2011), making exposure of diabetic patients to  $\beta$  adrenoceptor agonists a relevant question. Interestingly, in this study, improved glycemic control with asthma medication was observed. It may therefore be possible to use  $\beta_2$  adrenoceptor agonists to reduce neuropathic pain in diabetic patients without contraindication for glycemic control. In animal, as in humans, agonists of  $\beta$  adrenoceptors display an acute tendency to favor hyperglycemia. However, in the obese Zucker rat model of obesity and diabetes, clenbuterol (20-h half life) but not terbutaline (4-h half life) decreases insulin resistance and favors muscle glucose uptake (Castle et al., 2001; Pan et al., 2001), supporting an influence of pharmacokinetic parameters. These data have been recently confirmed in aged type 2 diabetic mice, where an acute treatment with the  $\beta_2$  adrenoceptor agonist salbutamol causes hyperglycemia whereas chronic treatment enhances insulin sensitivity, probably by improving muscle glucose uptake (Elayan et al., 2012).

In conclusion, the *ob/ob* mice represent a model of interest to study neuropathic pain associated with type 2 diabetes and

the mechanisms underlying its treatments. The present study indicates that  $\beta_2$  adrenoceptors and  $\delta$  opioid receptors are critical for the antiallostatic action of antidepressants in the context of diabetes, and that directly targeting the  $\beta_2$  adrenoceptors by agonists could be beneficial here. The translational relevance of these preclinical findings will however require clinical research on the impact of  $\beta_2$  adrenoceptor agonists on diabetic polyneuropathy.

## 4. Experimental procedures

### 4.1. Subjects

Experiments were conducted using adult male C57BL/6J-Lep<sup>ob</sup>/Lep<sup>ob</sup>, referred to as *ob/ob* mice, and C57BL6/J-Lep<sup>ob</sup>/+, referred to as *Lean* mice, purchased from Janvier (St. Berthevin, France) at 5 weeks of age. The mice were group-housed 4–5 per cage and maintained under standard conditions in the animal facilities at an ambient temperature of  $21 \pm 1$  °C and a 12 h light–dark cycle (lights on between 06:00 and 18:00). Food and water were available *ad libitum*. Experiments started after 2 weeks of habituation to the animal facilities. All behavioral studies were performed during the light period. At end of the experiments, mice were euthanized in a controlled CO<sub>2</sub> chamber according to standard guidelines. The animal facilities are legally registered for animal housing and experimentation (veterinary Animal House Agreement B67-482-1/C67-482-1). The scientists in charge of the experiments possess the French certificate authorizing experimentation on living animals, delivered by the governmental veterinary office. All procedures were performed in accordance with the guidelines for animal experimentation of the International Association for the Study of pain (IASP) and the European Communities Council Directive 86/609/EEC.

### 4.2. Blood glucose levels

Blood glucose levels were evaluated at 8 weeks of age. Following 6 h fasting, a drop of blood taken from the tail was analyzed using a standard glucometer (Accu-Chek Active Glucotrend, Roche).

### 4.3. Drug treatments

Treatments were tested in independent groups of mice. The intraperitoneal (i.p.) drug treatment began after the appearance of allodynia in *ob/ob* mice. All drugs (obtained from Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) were dissolved in 0.9% NaCl. To evaluate the acute effect of the TCA nortriptyline ( $5 \text{ mg.kg}^{-1}$ , i.p.), of the  $\beta_2$  adrenoceptor agonist terbutaline hemisulfate ( $0.5 \text{ mg.kg}^{-1}$ , i.p.), and of the 0.9% NaCl (i.p.), mice were tested before and 30, 60 and 90 min after the first injection. During chronic treatments, the mice then received 2 injections per day (morning/evening) for 2 to 3 weeks of nortriptyline ( $5 \text{ mg.kg}^{-1}$ , i.p.), terbutaline ( $0.5 \text{ mg.kg}^{-1}$ , i.p.) or 0.9% NaCl (i.p.). To evaluate the effect of these long-term treatments, the measures of mechanical sensitivity thresholds were performed before morning injections (i.e. at least 15 h following the previous



evening injection), and at least twice a week, as previously described (Benbouzid et al., 2008a).

After long-term nortriptyline or terbutaline treatments which resulted in relief of allodynia, we tested the role of adrenoceptors. To selectively block the  $\beta_2$  or the  $\alpha_2$  adrenoceptors, we used the antagonists ICI118551 (2 mg.kg<sup>-1</sup>) and yohimbine (2 mg.kg<sup>-1</sup>) respectively. In a sciatic nerve compression model, repeated blockade of  $\beta_2$  adrenoceptors is required to induce the relapse of allodynia in antidepressant treated mice (Yalcin et al., 2009a, 2009b). Accordingly, we mixed the antagonists with the chronic treatments and co-administered them morning and evening over 4 or 5 days, according to validated procedures (Yalcin et al., 2005, 2009a, 2009b). As we observed an effect of ICI118551 in *ob/ob* mice treated with nortriptyline or terbutaline, controls were also treated in separate groups to evaluate the action of ICI118551 alone in Lean and *ob/ob* mice over 5 days. For the study of the adrenergic antagonists, von Frey tests were performed on selected days, before the morning drug treatments (see above).

In a model of sciatic nerve compression, the acute blockade of  $\delta$  opioid receptors induces the relapse of allodynia in mice treated with nortriptyline (Benbouzid et al., 2008a, 2008b), with differences observed in the respective importance of  $\mu$  and  $\delta$  opioid receptors (Benbouzid et al., 2008b; Bohren et al., 2010). Accordingly, we acutely delivered naltrindole 5 mg.kg<sup>-1</sup> (antagonist of  $\delta$  opioid receptors), naloxonazine 30 mg.kg<sup>-1</sup> (antagonist of  $\mu$  opioid receptors) or 0.9% NaCl. These injections were administered subcutaneously (s.c.) in mice belonging to chronic Lean saline, *ob/ob* saline, *ob/ob* nortriptyline and *ob/ob* terbutaline groups. Mice were tested before and 30 min after acute administration. In a set of C57BL/6J mice, we also ensured that the chosen dose of naloxonazine blocked the acute analgesic action of 10 mg.kg<sup>-1</sup> of morphine (data not shown).

#### 4.4. Mechanical allodynia

The mechanical threshold for hindpaw withdrawal was evaluated using von Frey filaments (Bioseb, Chaville, France) as previously described (Bohren et al., 2010) and results were expressed in grams. The mice were placed in clear Plexiglas® boxes (7 cm × 9 cm × 7 cm) on an elevated mesh screen and allowed to habituate for 15 min before testing. The filaments were applied perpendicularly to the plantar surface of each hindpaw until they slightly bent (Barrot, 2012), in a series of ascending forces (0.07, 0.16, 0.4, 0.6, 1, 1.4, 2, 4, 6 and 8 g). Brisk withdrawal of the paw was considered as a positive response. In the absence of a response, a filament of next-greater force was applied. Each filament was tested five times per paw and the paw withdrawal threshold (PWT) was defined by three or more withdrawals observed out of the five trials. The mean threshold of both hindpaw was considered for each animal.

After 2 weeks of habituation to the animal facilities, mice were then habituated to the von Frey procedure by being tested twice, on separate days. After this habituation, chronically treated mice were tested at least twice a week. The mice displayed stable PWT values, as shown by the repeated measures in Lean mice (Fig. 1), in chronically saline-treated

mice (Figs. 2 and 3) and the lack of acute saline effect on PWT (Fig. 4).

#### 4.5. Statistical analysis

During the von Frey experiments, none of the animals reached the upper cut-off without displaying a response. Similarly, none of the animal responded to the lower cut-off. Data are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis were performed with STATISTICA 7.1 (Statsoft, Tulsa, OK, USA), using multi-factor analysis of variance (ANOVA). The groups (*ob/ob* or Lean mice and their saline or drug treatments) were taken as between-group factors. When needed, time (either time-course, or pre-injection vs. post-injection data) was taken as within-subject factor. When appropriate, the Duncan test was used for post-hoc comparisons. The significance level was set at  $p < 0.05$ .

#### Acknowledgments

Supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and by the University of Strasbourg (Contract UPR3212: N.C.J., M.J.F.M. and M.B.), by the Région Alsace and by a Conectus/Oseo grant (N.C.J. and M.B.). We thank Rachael Hawkes for her comments on the manuscript.

#### REFERENCES

- Allen, T.J., Cooper, M.E., Lan, H.Y., 2004. Use of genetic mouse models in the study of diabetic nephropathy. *Curr. Diab. Rep.* 4, 435–440.
- Alpers, C.E., Hudkins, K.L., 2011. Mouse models of diabetic nephropathy. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 20, 278–284.
- Attal, N., Cruccu, G., Baron, R., Haanpää, M., Hansson, P., Jensen, T.S., Nurmikko, T., European Federation of Neurological Societies, 2010. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *Eur. J. Neurol.* 17, 1113 (e88).
- Barrot, M., 2012. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience* 211, 39–50.
- Barrot, M., Yalcin, I., Choucair-Jaafar, N., Benbouzid, M., Freund-Mercier, M.J., 2009. From antidepressant drugs to beta-mimetics: preclinical insights on potential new treatments for neuropathic pain. *Recent Pat. CNS Drug. Discov.* 4, 182–189.
- Barrot, M., Yalcin, I., Tessier, L.H., Freund-Mercier, M.J., 2010. Antidepressant treatment of neuropathic pain: looking for the mechanism. *Future Neurol.* 5, 247–257.
- Bateman, S.M., Pidgeon, J., Spiro, S.G., Johnson, A.J., 1978. The metabolic effects of inhaled salbutamol. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 5, 127–129.
- Benbouzid, M., Choucair-Jaafar, N., Yalcin, I., Waltisperger, E., Muller, A., Freund-Mercier, M.J., Barrot, M., 2008a. Chronic, but not acute, tricyclic antidepressant treatment alleviates neuropathic allodynia after sciatic nerve cuffing in mice. *Eur. J. Pain* 12, 1008–1017.
- Benbouzid, M., Gavériaux-Ruff, C., Yalcin, I., Waltisperger, E., Tessier, L.H., Muller, A., Kieffer, B.L., Freund-Mercier, M.J., Barrot, M., 2008b.  $\delta$ -Opioid receptors are critical for tricyclic antidepressant treatment of neuropathic allodynia. *Biol. Psychiatry* 63, 633–636.
- Benbouzid, M., Pallage, V., Rajalu, M., Waltisperger, E., Doridot, S., Poisbeau, P., Freund-Mercier, M.J., Barrot, M., 2008c. Sciatic

- nerve cuffing in mice: a model of sustained neuropathic pain. *Eur. J. Pain* 12, 591–599.
- Binder, W., Mousa, S.A., Sitte, N., Kaiser, M., Stein, C., Schäfer, M., 2004. Sympathetic activation triggers endogenous opioid release and analgesia within peripheral inflamed tissue. *Eur. J. Neurosci.* 20, 92–100.
- Black, M.H., Anderson, A., Bell, R.A., Dabelea, D., Pihoker, C., Saydah, S., Seid, M., Standiford, D.A., Waitzfelder, B., Marcovina, S.M., Lawrence, J.M., 2011. Prevalence of asthma and its association with glycemic control among youth with diabetes. *Pediatrics* 128, e839–847.
- Bohren, Y., Karavelic, D., Tessier, L.H., Yalcin, I., Gavériaux-Ruff, C., Kieffer, B.L., Freund-Mercier, M.J., Barrot, M., 2010.  $\mu$ -opioid receptors are not necessary for nortriptyline treatment of neuropathic allodynia. *Eur. J. Pain* 14, 700–704.
- Bohren, Y., Tessier, L.H., Megat, S., Petitjean, H., Hugel, S., Daniel, D., Kremer, M., Fournel, S., Hein, L., Schlichter, R., Freund-Mercier, M.J., Yalcin, I., Barrot, M., 2013. Antidepressants suppress neuropathic pain by a peripheral  $\beta$ 2-adrenoceptor mediated anti-TNF $\alpha$  mechanism. *Neurobiol. Dis.* 60, 39–50.
- Cao, T.T., Brelot, A., von Zastrow, M., 2005. The composition of the beta-2 adrenergic receptor oligomer affects its membrane trafficking after ligand-induced endocytosis. *Mol. Pharmacol.* 67, 288–297.
- Castle, A., Yaspelkis 3rd, B.B., Kuo, C.H., Ivy, J.L., 2001. Attenuation of insulin resistance by chronic beta2-adrenergic agonist treatment possible muscle specific contributions. *Life Sci.* 69, 599–611.
- Choucair-Jaafar, N., Beetz, N., Gilsbach, R., Yalcin, I., Waltisperger, E., Freund-Mercier, M.J., Monassier, L., Hein, L., Barrot, M., 2011. Cardiovascular effects of chronic treatment with a  $\beta$ 2-adrenoceptor agonist relieving neuropathic pain in mice. *Neuropharmacology* 61, 51–60.
- Choucair-Jaafar, N., Yalcin, I., Rodeau, J.L., Waltisperger, E., Freund-Mercier, M.J., Barrot, M., 2009.  $\beta$ 2-Adrenoceptor agonists alleviate neuropathic allodynia in mice after chronic treatment. *Br. J. Pharmacol.* 158, 1683–1694.
- Cok, O.Y., Eker, H.E., Yalcin, I., Barrot, M., Aribogan, A., 2010. Is there a place for  $\beta$ -mimetics in clinical management of neuropathic pain? Salbutamol therapy in six cases. *Anesthesiology* 112, 1276–1279.
- Diatchenko, L., Anderson, A.D., Slade, G.D., Fillingim, R.B., Shabalina, S.A., Higgins, T.J., Sama, S., Belfer, I., Goldman, D., Max, M.B., Weir, B.S., Maixner, W., 2006. Three major haplotypes of the beta2 adrenergic receptor define psychological profile, blood pressure, and the risk for development of a common musculoskeletal pain disorder. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 141B, 449–462.
- Dick, I.E., Brochu, R.M., Purohit, Y., Kaczorowski, G.J., Martin, W.J., Priest, B.T., 2007. Sodium channel blockade may contribute to the analgesic efficacy of antidepressants. *J. Pain* 8, 315–324.
- Drel, V.R., Mashtalir, N., Ilnytska, O., Shin, J., Li, F., Lyzogubov, V.V., Obrosova, I.G., 2006. The leptin-deficient (ob/ob) mouse: a new animal model of peripheral neuropathy of type 2 diabetes and obesity. *Diabetes* 55, 3335–3343.
- Dworkin, R.H., O'Connor, A.B., Audette, J., Baron, R., Gourlay, G.K., Haanpää, M.L., Kent, J.L., Krane, E.J., Lebel, A.A., Levy, R.M., Mackey, S.C., Mayer, J., Miaskowski, C., Raja, S.N., Rice, A.S., Schmader, K.E., Stacey, B., Stanos, S., Treede, R.D., Turk, D.C., Walco, G.A., Wells, C.D., 2010. Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. *Mayo Clin. Proc.* 85, S3–14.
- Elayan, H., Milic, M., Sun, P., Gharaibeh, M., Ziegler, M.G., 2012. Chronic  $\beta$ 2 adrenergic agonist, but not exercise, improves glucose handling in older type 2 diabetic mice. *Cell. Mol. Neurobiol.* 32, 871–877.
- Exton, J.H., 1987. Mechanisms of hormonal regulation of hepatic glucose metabolism. *Diabetes Metab. Rev.* 3, 163–183.
- Guastella, V., Mick, G., 2009. Strategies for the diagnosis and treatment of neuropathic pain secondary to diabetic peripheral sensory polyneuropathy. *Diabet. Metab.* 35, 12–19.
- Gündogdu, A.S., Brown, P.M., Juul, S., Sachs, L., Sönksen, P.H., 1979. Comparison of hormonal and metabolic effects of salbutamol infusion in normal subjects and insulin-requiring diabetics. *Lancet* 2, 1317–1321.
- Hocking, L.J., Smith, B.H., Jones, G.T., Reid, D.M., Strachan, D.P., Macfarlane, G.J., 2010. Genetic variation in the beta2-adrenergic receptor but not catecholamine-O-methyltransferase predisposes to chronic pain: results from the 1958 British Birth Cohort study. *Pain* 149, 143–151.
- Huang, M.H., Wang, H.Q., Roeske, W.R., Birnbaum, Y., Wu, Y., Yang, N.P., Lin, Y., Ye, Y., McAdoo, D.J., Hughes, M.G., Lick, S.D., Boor, P.J., Lui, C.Y., Uretsky, B.F., 2007. Mediating delta-opioid-initiated heart protection via the beta2-adrenergic receptor: role of the intrinsic cardiac adrenergic cell. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293, H376–384.
- Huang, M.H., Nguyen, V., Wu, Y., Rastogi, S., Lui, C.Y., Birnbaum, Y., Wang, H.Q., Ware, D.L., Chauhan, M., Garg, N., Poh, K.K., Ye, L., Omar, A.R., Tan, H.C., Uretsky, B.F., Fujise, K., 2009. Reducing ischaemia/reperfusion injury through delta-opioid-regulated intrinsic cardiac adrenergic cells: adrenoceptor-mediated co-signalling. *Cardiovasc. Res.* 84, 452–460.
- Hudkins, K.L., Pichaiwong, W., Wietecha, T., Kowalewska, J., Banas, M.C., Spencer, M.W., Mühlfeld, A., Koelling, M., Pippin, J.W., Shankland, S.J., Askari, B., Rabaglia, M.E., Keller, M.P., Attie, A.D., Alpers, C.E., 2010. BTBR Ob/Ob mutant mice model progressive diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21, 1533–1542.
- Jaggi, A.S., Jain, V., Singh, N., 2011. Animal models of neuropathic pain. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 25, 1–28.
- Jordan, B.A., Trapaidze, N., Gomes, I., Nivarthi, R., Devi, L.A., 2001. Oligomerization of opioid receptors with beta 2-adrenergic receptors: a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 343–348.
- Kalezic, I., Luo, L., Lund, P.E., Eriksson, A.B., Bueters, T., Visser, S.A., 2013. In vivo and ex vivo inhibition of spinal nerve ligation-induced ectopic activity by sodium channel blockers correlate to in vitro inhibition of NaV1.7 and clinical efficacy: a pharmacokinetic-pharmacodynamic translational approach. *Pharm. Res.* 30, 1409–1422.
- Kelleher, D.L., Hicks, K.J., Cox, D.S., Williamson, R.R., Alpers, D.H., Dukes, G.E., 2008. Randomized, double-blind, placebo (PLA)-controlled, crossover study to evaluate efficacy and safety of the beta 3-adrenergic receptor agonist solabegron (SOL) in patients with irritable bowel syndrome (IBS). *Neurogastroenterol. Motil.* 20S1, 131.
- Koenen, T.B., Stienstra, R., van Tits, L.J., de Graaf, J., Stalenoef, A. F., Joosten, L.A., Tack, C.J., Netea, M.G., 2011. Hyperglycemia activates caspase-1 and TXNIP-mediated IL-1 $\beta$  transcription in human adipose tissue. *Diabetes* 60, 517–524.
- König, P., Goldstein, D., Poehlmann, M., Rife, D., Ge, B., Hewett, J., 2005. Effect of nebulized albuterol on blood glucose in patients with diabetes mellitus with and without cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 40, 105–108.
- Kou, Z.Z., Li, C.Y., Tang, J., Hu, J.C., Qu, J., Liao, Y.H., Wu, S.X., Li, H., Li, Y.Q., 2013. Down-regulation of insulin signaling is involved in painful diabetic neuropathy in type 2 diabetes. *Pain Physician* 16, E71–83.
- Latham, J.R., Pathirathna, S., Jagodic, M.M., Choe, W.J., Levin, M.E., Nelson, M.T., Lee, W.Y., Krishnan, K., Covey, D.F., Todorovic, S.M., Jevtovic-Todorovic, V., 2009. Selective T-type calcium channel blockade alleviates hyperalgesia in ob/ob mice. *Diabetes* 58, 2656–2665.

- Lee, H.S., Kim, K.R., Chung, W.H., Cho, Y.S., Hong, S.H., 2008. Early sensorineural hearing loss in ob/ob mouse, an animal model of type 2 diabetes. *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* 1, 211–216.
- Lenzen, S., 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51, 216–226.
- Light, K.C., Bragdon, E.E., Grewen, K.M., Brownley, K.A., Girdler, S.S., Maixner, W., 2009. Adrenergic dysregulation and pain with and without acute beta-blockade in women with fibromyalgia and temporomandibular disorder. *J. Pain* 10, 542–552.
- Lindström, P., 2007. The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. *Scientific World J.* 29, 666–685.
- Marchand, F., Ardid, D., Chapuy, E., Alloui, A., Jourdan, D., Eschalié, A., 2003. Evidence for an involvement of supraspinal delta- and spinal mu-opioid receptors in the antihyperalgesic effect of chronically administered clomipramine in mononeuropathic rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307, 268–274.
- Max, M.B., Lynch, S.A., Mir, J., Shoaf, S.E., Smoller, B., Dubner, R., 1992. Effects of desipramine, amitriptyline, and fluoxetine on pain in diabetic neuropathy. *N. Engl. J. Med.* 326, 1250–1256.
- Micó, J.A., Ardid, D., Berrocoso, E., Eschalié, A., 2006. Antidepressants and pain. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 348–354.
- Nakarai, H., Yamashita, A., Nagayasu, S., Iwashita, M., Kumamoto, S., Ohshima, H., Hata, M., Soga, Y., Kushiyama, A., Asano, T., Abiko, Y., Nishimura, F., 2012. Adipocyte-macrophage interaction may mediate LPS-induced low-grade inflammation: potential link with metabolic complications. *Innate Immun.* 18, 164–170.
- Nestler, E.J., Barrot, M., DiLeone, R.J., Eisch, A.J., Gold, S.J., Monteggia, L.M., 2002. Neurobiology of depression. *Neuron* 34, 13–25.
- Nguyen, V.T., Wu, Y., Guillory, A.N., McConnell, B.K., Fujise, K., Huang, M.H., 2012. Delta-opioid augments cardiac contraction through  $\beta$ -adrenergic and CGRP-receptor co-signaling. *Peptides* 33, 77–82.
- Nowicki, M., Kosacka, J., Serke, H., Blüher, M., Spaniel-Borowski, K., 2012. Altered sciatic nerve fiber morphology and endoneurial microvessels in mouse models relevant for obesity, peripheral diabetic polyneuropathy, and the metabolic syndrome. *J. Neurosci. Res.* 90, 122–131.
- Orestes, P., Osuru, H.P., McIntire, W.E., Jacus, M.O., Salajegheh, R., Jagodic, M.M., Choe, W., Lee, J., Lee, S.S., Rose, K.E., Pairo, N., Digruccio, M.R., Krishnan, K., Covey, D.F., Lee, J.H., Barrett, P.Q., Jevtovic-Todorovic, V., Todorovic, S.M., 2013. Reversal of neuropathic pain in diabetes by targeting glycosylation of cav3.2 T-type calcium channels. *Diabetes* 62, 3828–3838.
- Pan, S.J., Hancock, J., Ding, Z., Fogt, D., Lee, M., Ivy, J.L., 2001. Effects of clenbuterol on insulin resistance in conscious obese Zucker rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280, E554–E561.
- Ramsay, D., Kellett, E., McVey, M., Rees, S., Milligan, G., 2002. Homo- and hetero-oligomeric interactions between G-protein-coupled receptors in living cells monitored by two variants of bioluminescence resonance energy transfer (BRET): hetero-oligomers between receptor subtypes form more efficiently than between less closely related sequences. *Biochem. J.* 365, 429–440.
- Rees, D.A., Alcolado, J.C., 2005. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet. Med.* 22, 359–370.
- Rodgers, H.M., Liban, S., Wilson, L.M., 2014. Attenuated pain response of obese mice (B6.Cg-lep<sup>ob</sup>) is affected by aging and leptin but not sex. *Physiol. Behav.* 123, 80–85.
- Ross, S.A., Dzida, G., Vora, J., Khunti, K., Kaiser, M., Ligthelm, R.J., 2011. Impact of weight gain on outcomes in type 2 diabetes. *Curr. Med. Res. Opin.* 27, 1431–1438.
- Saarto, T., Wiffen, P.J., 2010. Antidepressants for neuropathic pain: a Cochrane review. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 81, 1372–1373.
- Smith, S.R., Ryder, C., Kendall, M.J., Holder, R., 1984. Cardiovascular and biochemical responses to nebulised salbutamol in normal subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 18, 641–644.
- Tchivileva, I.E., Lim, P.F., Smith, S.B., Slade, G.D., Diatchenko, L., McLean, S.A., Maixner, W., 2010. Effect of catechol-O-methyltransferase polymorphism on response to propranolol therapy in chronic musculoskeletal pain: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover pilot study. *Pharmacogenet. Genomics* 20, 239–248.
- Torella, R., Grandillo, F., Giugliano, D., Improta, L., Varricchio, M., 1980. The effects of salbutamol on some metabolic and endocrine patterns of diabetic subjects. *Pharmacol. Res. Commun.* 12, 909–919.
- Tsankova, N., Renthal, W., Kumar, A., Nestler, E.J., 2007. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 355–367.
- Ursino, M.G., Vasina, V., Raschi, E., Crema, F., De Ponti, F., 2009. The beta3-adrenoceptor as a therapeutic target: current perspectives. *Pharmacol. Res.* 59, 221–234.
- Van der Mieren, G., Nevelsteen, I., Vanderper, A., Oosterlinck, W., Flameng, W., Herijgers, P., 2012. Angiotensin-converting enzyme inhibition and food restriction in diabetic mice do not correct the increased sensitivity for ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc. Diabetol.* 11, 89.
- Vareniuk, I., Pavlov, I.A., Drel, V.R., Lyzogubov, V.V., Ilnytska, O., Bell, S.R., Tibrewala, J., Groves, J.T., Obrosova, I.G., 2007. Nitrosative stress and peripheral diabetic neuropathy in leptin-deficient (ob/ob) mice. *Exp. Neurol.* 205, 425–436.
- Vargas-Alarcón, G., Fragoso, J.M., Cruz-Robles, D., Vargas, A., Martínez, A., Lao-Villadóniga, J.I., García-Fructuoso, F., Vallejo, M., Martínez-Lavín, M., 2009. Association of adrenergic receptor gene polymorphisms with different fibromyalgia syndrome domains. *Arthritis Rheum.* 60, 2169–2173.
- Vincent, A.M., Feldman, E.L., 2004. New insights into the mechanisms of diabetic neuropathy. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 5, 227–236.
- Wiethop, B.V., Cryer, P.E., 1993a. Glycemic actions of alanine and terbutaline in IDDM. *Diabet. Care* 8, 1124–1130.
- Wiethop, B.V., Cryer, P.E., 1993b. Alanine and terbutaline in treatment of hypoglycemia in IDDM. *Diabet. Care* 16, 1131–1136.
- Yalcin, I., Aksu, F., Belzung, C., 2005. Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. *Eur. J. Pharmacol.* 514, 165–174.
- Yalcin, I., Choucair-Jaafar, N., Benbouzid, M., Tessier, L.H., Muller, A., Hein, L., Freund-Mercier, M.J., Barrot, M., 2009a.  $\beta_2$ -Adrenoceptors are critical for antidepressant treatment of neuropathic pain. *Ann. Neurol.* 65, 218–225.
- Yalcin, I., Tessier, L.H., Petit-Demoulière, N., Doridot, S., Hein, L., Freund-Mercier, M.J., Barrot, M., 2009b.  $\beta_2$ -Adrenoceptors are essential for desipramine, venlafaxine or reboxetine action in neuropathic pain. *Neurobiol. Dis.* 33, 386–394.
- Yalcin, I., Tessier, L.H., Petit-Demoulière, N., Waltisperger, E., Hein, L., Freund-Mercier, M.J., Barrot, M., 2010. Chronic treatment with agonists of  $\beta_2$ -adrenergic receptors in neuropathic pain. *Exp. Neurol.* 221, 115–121.
- Zhao, X., Xu, Y., Zhao, Q., Chen, C.R., Liu, A.M., Huang, Z.L., 2012. Curcumin exerts antinociceptive effects in a mouse model of neuropathic pain: descending monoamine system and opioid receptors are differentially involved. *Neuropharmacology* 62, 843–854.

## Ré sulta ts : c ha pitre IV.

---

### Epidé miologie des doule urs neuropathiques post-c hirurgic ales

#### A. Introduction

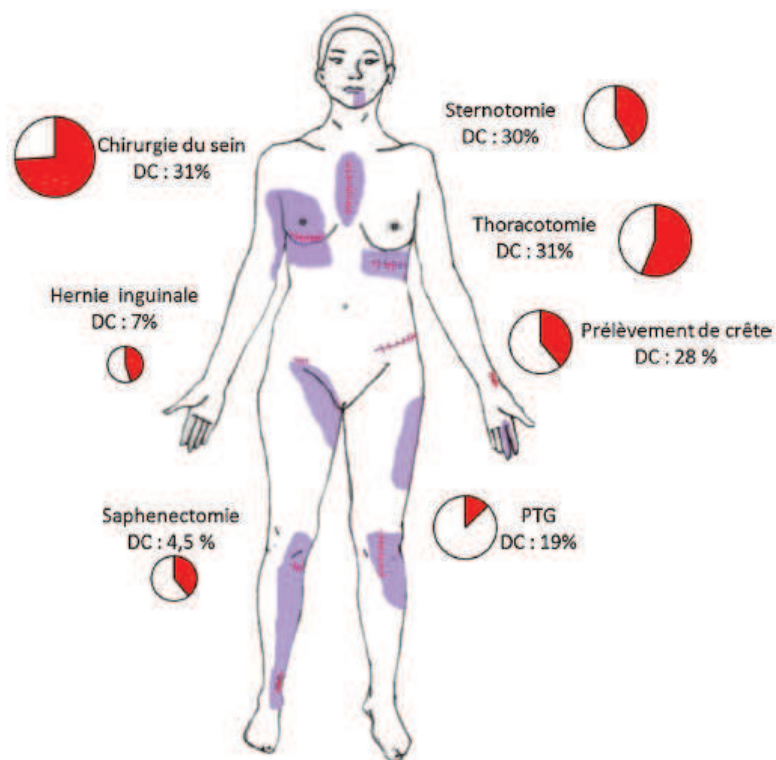
Pour connaître la prévalence ou l'incidence d'une pathologie à grande échelle, il est nécessaire de recourir à des outils de dépistages validés à la fois pour cette pathologie et pour la langue de la population étudiée. Dans le cas des douleurs neuropathiques, les critères diagnostiques répondent à la définition de l'IASP et une gradation du diagnostic a été proposée. Pour ce qui est des outils d'aide au diagnostic, le DN4 (Bouhassira et al, 2005) et le Leeds Assessment of Neuropathic Symptoms and Signs (LANSS) (Bennett, 2001) sont validés et ont été utilisés dans plusieurs études épidémiologiques de grande envergure. Cela est rendu possible par le caractère d'auto-évaluation de ces questionnaires, qui permet de s'adresser à un grand nombre de personnes par voie postale ou téléphonique. A l'aide de ces questionnaires, il a été possible de réaliser des enquêtes épidémiologiques sur la prévalence des douleurs neuropathiques dans la population générale. Ainsi, en 2008 l'étude STOPNEP montrait en France une prévalence de 6,9% de douleurs chroniques avec une composante neuropathique (Bouhassira et al, 2008). Ces données sont proches d'autres grandes enquêtes qui utilisent le DN4 ou le LANSS avec des résultats de prévalence qui sont au final compris entre 6,9 et 10% selon la population étudiée (Torrance et al, 2006; Bouhassira et al, 2008; Yawn et al, 2009; de Moraes Vieira et al, 2012). En ce qui concerne l'incidence, une enquête réalisée sur la base de données informatisées montrait dans la population néerlandaise la survenue de douleurs d'aspect neuropathiques chez 8 personnes pour mille et par an (Dieleman et al, 2008). Une revue de ces études montre que les étiologies les plus fréquemment identifiées, tant en termes de prévalence que d'incidence, sont les douleurs neuropathiques du diabète, post-zostériennes, les névralgies crâniennes et les douleurs du membre fantôme (van Hecke et al, 2014). Si ces dernières, qu'elles soient d'origines traumatiques ou chirurgicales, sont connues et identifiées de longue date (Jensen et al, 1983), la prévalence des douleurs chroniques post-chirurgicales ne fait l'objet d'études que depuis ces deux dernières décades (Kehlet et al, 2006; Macrae, 2008). La définition de l'IASP des douleurs post-chirurgicales est la suivante : une douleur apparue après la chirurgie et persistante plus de 2 mois après une opération, et ne pouvant être expliquée par une autre

cause (récurrence de la maladie ou infection par exemple) ni préexistante à l'opération. Cette définition est discutée car elle n'inclut pas d'information plus précise que le délai et l'exclusion d'autres pathologies (Kehlet and Rathmell, 2010). Par conséquent, les études épidémiologiques sur ce type de douleur vont montrer des résultats d'une grande variabilité pour un même type d'intervention, en raison de critères et de méthodologies très hétérogènes. Par exemple, l'incidence globale des douleurs post-chirurgicales est de 30% et passe à 5-10% si l'on ne considère que les douleurs d'intensité sévère (Kehlet et al., 2006). L'étude de cohorte TROMSO sur la population générale norvégienne montre que 18% de la population opérée dans les 3 années précédentes souffre de douleurs modérées à intenses, dont la moitié de ces douleurs a des caractéristiques neuropathiques et les 2/3 touchent les membres (Johansen et al., 2012). En ce qui concerne la composante neuropathique de ces douleurs post-chirurgicales, il existe là-encore une variabilité de l'évaluation en fonction des critères retenus. Si pendant longtemps les lésions nerveuses, rendues obligatoires par le geste chirurgical, ont été considérées comme étant la cause la plus probable des douleurs chroniques post-opératoires, le caractère neuropathique n'est pas toujours authentifié selon des critères validés, comme la gradation diagnostique ou le questionnaire DN4 (Bouhassira et al., 2004; Treede et al., 2008; Haroutiunian et al., 2013). En effet, les douleurs neuropathiques ne sont pas les seules douleurs post-opératoires : la chirurgie peut également entraîner une algodystrophie ou Syndrome Douloureux Régional Complexe de type 1 (SDRC1), en particulier après une chirurgie orthopédique (de Mos et al., 2007).

Néanmoins, il ressort de plusieurs revues récentes que certaines chirurgies sont effectivement plus à risque de générer des douleurs neuropathiques chroniques que d'autres (Haroutiunian et al., 2013; Martinez et al., 2013; Duale et al., 2014). En effet, en dehors des amputations, des chirurgies plus courantes comme la chirurgie thoracique (thoracotomie), la chirurgie du sein, la cure de hernie inguinale ou le prélèvement osseux sur la crête iliaque sont pourvoyeuses de douleurs neuropathiques chroniques. La localisation et la fréquence de ces douleurs sont illustrées dans la **figure R-2**.

Ces études épidémiologiques sur les douleurs post-chirurgicales sont fondamentales à plus d'un égard. D'abord parce qu'au regard des 7 à 8 millions d'interventions chirurgicales par an en France, il est important d'en connaître les

conséquences en termes de douleurs chroniques iatrogènes et de retentissement sur la qualité de vie des patients et la prise en charge de la douleur. Ensuite parce qu'identifier les facteurs de risques de développer une douleur chronique neuropathique ne peut se faire que par le biais d'études qui s'appuieront sur ces données épidémiologiques et qui permettront à l'avenir de prévenir ou limiter la survenue de ces douleurs. Un des principaux facteurs de risque est, comme nous venons de le voir, le type de chirurgie. La thoracotomie et la chirurgie pour cancer du sein qui sont les deux grands types d'interventions génératrices de douleurs neuropathiques chroniques ont fait l'objet d'améliorations de procédures qui limitent potentiellement l'agression du système nerveux (usage de la thoracoscopie ou écarteurs moins invasifs pour la thoracotomie, exercice du ganglion sentinelle au lieu du curage axillaire pour la chirurgie sénologique, par exemple) et devrait potentiellement faire diminuer l'incidence de ces douleurs. Les lésions nerveuses au cours d'un geste chirurgical peuvent relever de différents types d'agressions : étirement, section, écrasement. Pour autant, toutes ces lésions ne se compliquent pas de douleurs neuropathiques, même si elles sont fréquemment suivies de déficit sensitif dans le territoire correspondant. Le lien entre le déficit sensitif observé et la survenue ou l'absence de douleur neuropathique post-chirurgicale n'est pas établi. Néanmoins, il est admis que l'intensité des douleurs chroniques post-chirurgicales soit corrélée avec différents facteurs comme par exemple la présence d'une douleur pré-opératoire sur le site de la chirurgie ou sur une autre partie du corps (Gerbershagen et al., 2009) et la prise de morphiniques (Katz et al., 2005), et en post-opératoire avec la douleur aiguë et l'hyperalgésie (Bisgaard et al., 2005; Dennis and O'Riordan, 2007; Althaus et al., 2012; Johansen et al., 2014). L'ensemble de ces facteurs est probablement le reflet du phénomène de sensibilisation du système nerveux central dont nous avons vu l'importance dans la pérennisation des douleurs neuropathiques. Il est donc légitime d'évoquer une prévention médicamenteuse de cette sensibilisation du système nerveux et d'étudier à cet effet des molécules comme la kétamine, antagoniste des récepteurs NMDA, ou des gabapentinoïdes, inhibiteurs des canaux calcium voltage-dépendants ou encore la venlafaxine, un antidépresseur IRSNA (Dahl and Kehlet, 2011).



**Figure R-2. Incidence de la douleur chronique postchirurgicale et part des douleurs neuropathiques selon la chirurgie. La taille des camemberts correspond à l'incidence des douleurs chroniques. Le pourcentage des douleurs neuropathiques est représenté en rouge. D'après martinez et al, 2013.**

Mon travail de thèse s'est effectué au sein d'une équipe qui a démontré dans un modèle murin que l'effet anti-allodynique des antidépresseurs, tricycliques et IRSNA, sur les douleurs neuropathiques passe par les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques. Sur le même modèle, nous avons observé que l'administration de  $\beta_2$ -agonistes soulage l'allodynie neuropathique. Pour rechercher un éventuel lien entre la prise de  $\beta_2$ -agonistes et la survenue de douleurs neuropathiques post-chirurgicales, j'ai réalisé un travail d'enquête épidémiologique rétrospectif portant sur des patients qui ont subi une thoracotomie. Le choix de ce type de patients a été orienté par la forte prévalence de douleurs neuropathiques après thoracotomie dans les données de la littérature. J'ai interrogé et examiné ces patients lors de leur visite de contrôle chez le même chirurgien thoracique. Ce travail d'enquête fait l'objet d'un article soumis pour publication sous le titre : « Effects of  $\beta_2$ -agonists on post-thoracotomy pain incidence » et qui est présenté à la suite de cette introduction.



## Effects of beta2 agonists on post-thoracotomy pain incidence

E. Salvat<sup>1</sup>, B. Schweitzer<sup>2</sup>, G. Massard<sup>3</sup>, N. Meyer<sup>4</sup>, F. de Blay<sup>3</sup>, A. Muller<sup>1\*</sup> and M. Barrot<sup>5\*</sup>

- 1 Centre d'Evaluation et de Traitement de la Douleur, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Université de Strasbourg, France
- 2 Département d'Anesthésie-Réanimation Chirurgicale, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Université de Strasbourg, France
- 3 Département de Pathologies Thoraciques, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Université de Strasbourg, France
- 4 Service de Santé Publique, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Université de Strasbourg, France
- 5 Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique, France

\* M.B. and A.M. equally contributed to this work

Correspondence: Eric Salvat Centre d'Evaluation et de Traitement de la Douleur 1 Place de l'Hôpital, BP 426, 67091 Strasbourg Cedex, France. Phone: 0033388116483 Fax: 0033388115873 E-mail: [eric.salvat@chru-strasbourg.fr](mailto:eric.salvat@chru-strasbourg.fr)

Funding sources: this work was supported by Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Université de Strasbourg and Centre National de la Recherche Scientifique.

## Introduction

Thoracic surgery is known to induce persistent pain which can be severe, in particular with thoracotomy (Kehlet et al., 2006). Indeed, a mean 52% incidence places thoracotomy among surgeries presenting the highest risk for developing chronic pain (Pluijms et al., 2006). The International Association for the Study of Pain defines chronic post-thoracotomy pain as pain that recurs or persists along a thoracotomy scar more than 2 months after surgery (IASP, 1986). Studies on chronic post-thoracotomy pain have shown a predominance of neuropathic characteristics of such pain (Guastella et al., 2011), and it has been suggested that the intercostal nerve damage is its most likely cause (Wildgaard et al., 2012). This neuropathic pain is a neurological syndrome which is associated with distress and reduced quality of life (Jensen et al., 2007), stressing the need to look further into the factors of risk or prevention.

The patients undergoing thoracotomy can also display respiratory deficits that require the use of  $\beta_2$ -agonists, such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Interestingly, it has been demonstrated in a murine model of neuropathic pain that  $\beta_2$ -adrenoceptors ( $\beta_2$ -ARs) are essential for the antiallodynic action of antidepressant drugs (Uzumcugil et al., 2009; Yalcin et al., 2009) that are a first-line treatment of neuropathic pain (Attal et al., 2010; Dworkin et al., 2007), and that a chronic treatment with  $\beta_2$ -agonists may have the same antiallodynic effect as antidepressant drugs (Choucair-Jaafar et al., 2009; Perttunen et al., 1999; Yalcin et al., 2010). These preclinical data are supported by a case report suggesting a beneficial action of a  $\beta_2$ -AR agonist in neuropathic pain (Cok et al., 2010). To investigate whether  $\beta_2$ -agonist treatment could influence the incidence of chronic post-thoracotomy pain, considering also the pain characteristics (neuropathic vs. non-neuropathic), we performed an observational study, collecting data on clinical characteristics of patients who underwent thoracotomy.

## **1. Methods**

This retrospective study was performed over a period of 8 months in the department of Thoracic Surgery from the Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS) in France. It was conducted in accordance with the Good Clinical Practice and local laws: this study was declared to CNIL (“Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés”) and it received institutional ethics approval from Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France.

### **2.1 Patients and surgery**

Between August 2010 and March 2011, two hundred fifty one patients were consecutively screened for potential inclusion in the study during the follow-up consultations (one day a week) of the same thoracic surgeon at the HUS. The patients were examined and questioned at least 3 months after surgery. Every patient received information concerning the investigation before giving their consent to participation. Only patients who underwent lateral thoracotomy were then included in the study. Patients with a history of neurological painful disorder, of previous thoracic pain or who had required chest wall resection were excluded from the study (62 out of the 251 patients). Patients' characteristics are given Table 1.

### **2.2 Data collection procedure**

Information on the disease having justified the intervention, on the date and the extent of the surgery and on the anesthesia, including premedication, were obtained from the patient medical files (including the anesthesia record). For each patient, the following data were also obtained from the medical files: age, sex, medical and surgical histories as well as the list of drugs the patients were taking at surgery period. Within the present study, these information were verbally confirmed by the patient during the anamnesis.

Special attention has been given to chronic  $\beta_2$ -agonist treatments: which one, regular or occasional use and since when. The information concerning the exposure to  $\beta_2$ -agonists in the preoperative and immediate postoperative periods was obtained from the anesthesia record of the patient's medical file. The information concerning the exposure

to  $\beta_2$ -agonists during the period between the surgery and the present study was obtained from the patient's medical file (information recorded during the yearly follow up visit). During the anamnesis conducted for this study, the use of  $\beta_2$ -agonists was also confirmed by the patient. The occasional use of these treatments (e.g in case of asthma attack or asthma symptoms) was not retained, and only a meaningful exposure to  $\beta_2$ -agonists (i.e. at least once or twice daily) was considered as a chronic treatment. Detailed  $\beta_2$ -agonist treatments are presented TableS1.

### **2.3 Clinical examination and pain assessment**

Patients were asked about the presence of chronic pain in the chest by two questions: are you regularly suffering from pain at scar level? If yes: how long has this pain been present? The clinical evaluation was continued for patients with post-thoracotomy chronic pain at scar level. They were examined at the thoracic level, with particular attention to the scar area, looking for inflammatory or infectious lesion. The daily average intensity of pain was evaluated for each patient, using the 11 points Numeric Scale (NS) (0 = no pain to 10 = pain as bad as you can imagine) (Cleeland and Ryan, 1994). The neuropathic characteristics of the pain were assessed with the DN4 questionnaire (Bouhassira et al., 2005). The presence of mechanical allodynia in the scar area was tested by comparing the operated side of the chest to the contralateral side, using a brush (SENSELab™ Brush 0.5, Somedic) and a calibrated von Frey filament (N°12 Somedic). We considered the chronic pain as neuropathic when there was a combination of pain and sensory signs (i.e. allodynia or loss of sensory response) in the scar area, in patients with a DN4 questionnaire equal to or greater than 4. All patients were examined by the same investigator (see figureS1, which is the data collection form used by the investigator).

### **2.4 Statistical analysis**

Qualitative data were described with contingency tables and quantitative data are described as mean (+/- standard deviation). Groups were compared using either chi-square test or ANOVA. Ascending stepwise multinomial logistic regressions or binomial logistic regressions were used to predict the type of pain (respectively: none, considered

as reference / chronic non-neuropathic / neuropathic; and: none / chronic pain).  $\beta_2$ -agonist effect was adjusted on propensity score. All computations were done with SPSS 12.0 Statistic-program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A  $p$ -value  $< 0.05$  was considered as significant.

## 2. Results

### 3.1 Characteristics of the patients

The diagram of study recruitment is shown in Fig. 1. In total, we included and examined 189 patients, 133 men and 56 women,  $58 \pm 12.2$  (18-80) years old, who underwent lateral thoracotomy. Most of the patients (84%) underwent the surgery within the 7 years before the inclusion. Patient characteristics are reported in Table 1. Most patients underwent the surgery for lung cancer (84%). Thoracotomy was performed with the same lateral approach on the fifth intercostal space by the same surgeon for all patients. Thirty two patients underwent major surgical procedures such as pneumectomy or bilobectomy, while 157 patients underwent minor surgical procedures like lobectomy, segmentectomy, wedge resection or biopsy. Before surgery, 61 patients (32%) received premedication with a single dose of 600 mg oral gabapentin. During surgery, anesthesia was performed using intravenous propofol, midazolam, sufentanil, ketamine and cisatracurium. Hundred twenty five patients (66%) received thoracic epidural anesthesia with naropeine and sufentanil, starting during the preoperative period and continuing for 3 days postoperatively. Early postoperative pain relief was managed during 72 hours with IV administered morphine sulfate in a Patient Controlled Analgesia (PCA) pump for all patients. The most common medicinal treatments chronically used (daily, for more than 3 months) were inhaled  $\beta_2$ -agonists (long or short acting, sometimes both associated) with or without inhaled steroids (TableS1).

A persisting thoracic pain was reported in 81 patients (43%). For all these patients, thoracic pain started within weeks post-surgery and was persisting at inclusion time ( $> 3$  months post-surgery). The reported pain intensity was 2 to 8 (mean = 4.6, sd = 1.2) on the Numeric Scale. Fifteen patients reported a light chronic pain (NS score  $< 4$ ), among them 3 patients reported a 2/10 pain score and 12 patients a 3/10. Sixty-four patients

reported moderate pain (NS score between 4 and 7) and 2 patients reported a severe pain (NS score > 7). Pain characteristics were assessed for all patients with pain, regardless of the intensity of their pain on NS scores. Twenty-three painful patients had non-neuropathic pain while neuropathic characteristics were found in 58 patients, with an association of pain and sensory signs confined at the metameric scar level. According to the grading criteria supported by the NeuPSIG Task Force (Treede et al., 2008), these patients suffered from probable neuropathic pain.

### **3.2 Predictors of pain**

The analysis of risk factors and of current perioperative treatment showed no significant influence of age, sex, type of surgical intervention, history of thoracic epidural anesthesia, gabapentin premedication or many commonly used drugs on the prevalence of chronic pain or neuropathic pain (Table 1). A multivariate multinomial logistic regression showed that the chronic use of  $\beta_2$ -agonists ( $p < 0.001$ ) and the etiology (malignant or benign) ( $p = 0.002$ ) were independent predictors of pain, time was not an independent predictive factor associated with neuropathic pain incidence ( $p = 0.417$ ). The use of  $\beta_2$ -agonists was associated with a lower probability of observing a neuropathic pain vs. no pain (OR = 0.19 [0.06 – 0.45]) but not with a lower probability of non-neuropathic chronic pain vs. no pain (OR = 0.91 [0.35 – 2.36]) (Table 2). Malignant tumor was also associated with a lower risk of observing neuropathic pain vs. no pain (OR = 0.22 [0.09 – 0.56]) while no difference was observed for non-neuropathic chronic pain vs. no pain (OR = 1.18 [0.24 – 5.75]).

To further control for risk of confounders, complementary analyses were performed using a binomial regression (Table 3) and propensity scores (Table 4). The binomial logistic regression showed that factors such as age, gender, delay post-surgery, extent of the surgical procedure and other tested clinical characteristics did not predict the effect of  $\beta_2$ -agonists (Table 3). Moreover, the effect of  $\beta_2$ -agonist treatment on the neuropathic pain incidence was persistent after adjustment for clinical characteristics with a propensity score (propensity score-adjusted OR = 0.19 [0.06 – 0.60], Propensity Score = 1.04 [0.18 – 5.87]) (Table 4). In parallel, we also used data reduction strategies to address confounders that may be related to the presence of cancer, to the type of

surgery and to the delay post-surgery. Among the 189 patients, 159 presented the same etiology (cancer) and an effect of  $\beta_2$ -agonist treatment on the neuropathic pain incidence was present in these patients after adjustment for clinical characteristics with a propensity score (propensity score-adjusted OR = 0.21 [0.05 – 0.87], Propensity Score = 0.34 [0.03 – 3.34]) (Table 4). Moreover, 106 patients shared a same etiology (cancer) and a same type of surgery (lobectomy). In these patients, the use of  $\beta_2$ -agonists remained associated with a lower probability of observing neuropathic pain vs. no pain (OR = 0.06 [0.01 – 0.47]) (Table 5). A binomial logistic regression in these 106 patients showed that factors such as age, gender, delay post-surgery and other tested clinical characteristics did not predict the effect of  $\beta_2$ -agonists (Table 6). Last, we also restricted the analysis to lobectomy/cancer patients who underwent surgery in the 2003-2009 period (i.e. 3.4 $\pm$ 2 years post-surgery), which corresponded to 73 patients. In these patients, the use of  $\beta_2$ -agonists remained associated with a lower probability of observing neuropathic pain vs. no pain (OR = 0.09 [0.01 – 0.74]) (Table 5).

### **3. Discussion**

This analysis of data shows a five-fold lower risk of incidence of post-thoracotomy neuropathic pain in patients treated with  $\beta_2$ -agonists.

The patient population in our study is similar to that studied in other epidemiological studies in terms of typology, prevalence of chronic post-thoracotomy pain and proportion of neuropathic pain characteristics (Guastella et al., 2011; Kehlet et al., 2006). In the Department of Thoracic Surgery of Strasbourg, the patients who underwent thoracotomy are seen again by the surgeon at one month and at 3 months after the surgery, and then once a year if patients were operated for a cancer, or once a year during a few years if operated for another reason. This local standardized practice for thoracic surgeons at HUS allowed us to screen a group of patients operated by the same surgeon, with the same procedures except for some differences in recent anesthetic protocols such as epidural anesthesia or preemptive gabapentin. The longer term follow-up for patients with cancer also account for the strong prevalence of these patients (84%) in this study.

All included patients who reporting pain at scar level, whatever the intensity of pain, underwent a physical examination. The combination of the DN4 score and the clinical examination was only used to distinguish neuropathic from non-neuropathic pain; however, we didn't report on the questionnaire the quantification of evoked and/or spontaneous pain, allodynia and hypoesthesia at scar level. Unfortunately, this prevented us from investigating the correlation between  $\beta_2$ -agonist treatments and the detailed clinical spectrum of neuropathic pain. Therefore the present study allowed studying the influence of  $\beta_2$ -agonists on neuropathic pain, but it did not allow the discrimination of whether the effect of  $\beta_2$ -agonists was mainly on the evoked or on the spontaneous aspects of pain.

The presence of preoperative pain, the intensity of pain during the first few postoperative days, the gender and the age have all been implicated in the development of chronic pain (Gottschalk and Ochroch, 2008). In our survey, age or gender did not significantly affect the incidence of pain. Similarly, a preoperative single oral dose of gabapentin or an epidural complementary analgesia had no effect on the longer-term development of neuropathic pain. However, the presence of preoperative pain was a criterion for non-inclusion in our study, and pain on postoperative days was not recorded for these patients. Surprisingly, the risk of developing neuropathic pain is lower in patients with cancer than in patients with a non-malignant pathology. While we have no biological explanation to this observation, some limitations should here be considered. First, the patients with a non-malignant pathology represented only 16% (30/189) of the patients included in the study. Second, a possible recruitment bias may be present in this subgroup of patients. Indeed, while yearly follow up visits were systematic for patients who were operated for a cancer, such visits were at the discretion of the surgeon for patients operated for another reason. This could potentially increase the prevalence of patients with aftereffects, including pain, in the latter subgroup. The high proportion of chronic pain in these 30 patients (19/30, i.e. 63%) would be supportive of such possible bias. The effect of malignancy should thus be considered with caution. The focus on chronic treatments taken regularly in the pre- and post-thoracotomy periods was informative. We observed an apparent lack of effect of treatments that would be expected to have a potential impact on the onset of neuropathic pain



(anticonvulsants, antidepressants e.g.) but the power of the analysis is limited by the small number of patients for each of these drugs. In contrast, thoracotomy was performed in a significant number of patients with impaired respiratory function and therefore using inhaled chronic treatments by  $\beta_2$ -agonist for some of them. These patients showed the same risk of developing non-neuropathic chronic pain, while the risk of developing neuropathic chronic pain was greatly reduced. This effect is thus dependent on the type of chronic pain, but is statistically independent on the considered type of  $\beta_2$ -agonists (short- or long-acting) and of the association with inhaled steroids. The validation of this beneficial effect of  $\beta_2$ -agonists on post-thoracotomy neuropathic pain required considering potential confounders, including for example the type of surgery (Pluijms et al., 2006), the etiology or the delay post-surgery (Perttunen et al., 1999). To control for confounders, we thus performed supplemental analyses, by adjusting the effect of  $\beta_2$ -agonists on each potential confounder with a binomial logistic regression, by using propensity scores, and by using a strategy of data reduction. In each case, results are supportive of a significant effect of  $\beta_2$ -agonists on the decrease incidence of neuropathic pain. However, a causative role is hard to determine in a retrospective study.

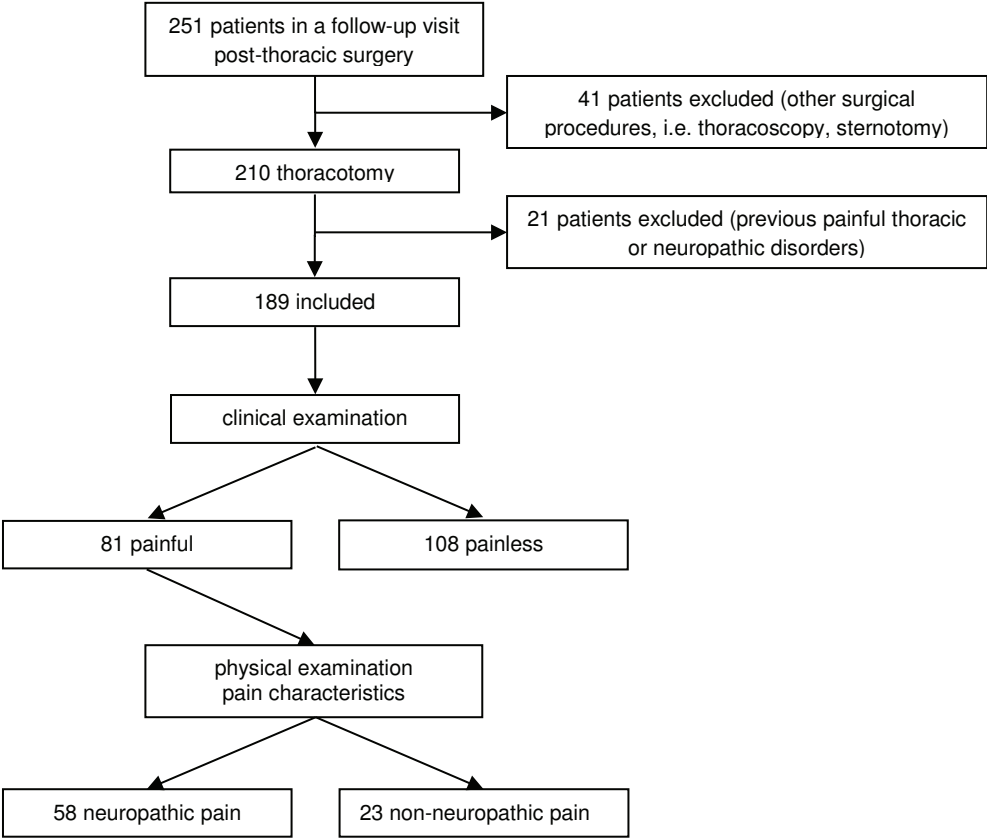
The retrospective and the single-center aspects of the study are strong limitations. Indeed, tobacco-consumption, potentially more frequent medical care associated with COPD or lung cancer, psychosocial comorbidity and genetic predisposition were not considered. While the present results suggest an association of  $\beta_2$ -agonist treatment with a lower risk to have post-thoracotomy neuropathic pain, we cannot exclude the existence of yet unidentified factors that could be actual confounders.

These findings raise the question of the relation between  $\beta_2$ -ARs and pain. The present works appears to confirm a beneficial impact of  $\beta_2$ -agonists on neuropathic pain and their lack of effect on the incidence of non-neuropathic pain. The pain-type specificity of  $\beta$ -adrenoceptor manipulation is also supported by other studies showing that, contrary to present data on neuropathic pain, musculoskeletal pain can be improved by low-dose of a nonselective  $\beta$ -antagonist (Light et al., 2009). In our study, a logistic nominal regression was used to analyze an effect of chronic  $\beta$ -antagonist treatment on the presence or the type of pain. The effective was however insufficient (19

patients under  $\beta$ -antagonist) and the results were non-significant. Based on preclinical work, we have evidence that  $\beta_2$ -ARs are not implicated in neuropathic pain itself, but are rather key therapeutic mediators. Indeed, symptoms such as mechanical allodynia are not affected by a  $\beta_2$ -AR antagonist in a lesional (Yalcin et al., 2009) or a diabetic (Choucair-Jaafar et al., 2014) murine model of neuropathic pain, and neuropathic allodynia is not affected either in  $\beta_2$ -AR-deficient mice (Perttunen et al., 1999; Uzumcugil et al., 2009; Yalcin et al., 2009). The  $\beta_2$ -ARs are, however, necessary to the antiallodynic action of antidepressant drugs (Bohren et al., 2013; Choucair-Jaafar et al., 2011; Choucair-Jaafar et al., 2014; Uzumcugil et al., 2009; Yalcin et al., 2009), and  $\beta_2$ -agonists alone are sufficient after chronic treatment to provide relief in lesional (Bohren et al., 2013; Choucair-Jaafar et al., 2011; Choucair-Jaafar et al., 2009; Yalcin et al., 2010) or diabetic (Choucair-Jaafar et al., 2014) murine models of neuropathic pain. Moreover, preclinical data suggest that the action of  $\beta_2$ -agonists on neuropathic allodynia involves a  $\beta_2$ -AR-mediated inhibition of the glial production of cytokine (Bohren et al., 2013). Various data suggest that neuropathic pain has a neuroimmune component, with a critical involvement of glial and/or immune cells following nerve injury (Kim and Moalem-Taylor, 2011; Thacker et al., 2007; Vallejo et al., 2010) and with the production of cytokines participating in the pathophysiology of neuropathic pain (Leung and Cahill, 2010; Sommer et al., 2001; Wagner and Myers, 1996). An action of chronic  $\beta_2$ -agonists on these mechanisms (Bohren et al., 2013) could explain the lower incidence of neuropathic pain after thoracotomy, but exploring this hypothesis will require further research.

In conclusion, the use of  $\beta_2$ -agonists is associated with a lower incidence of post-thoracotomy chronic neuropathic pain. Present results are however limited by the retrospective aspect of the study. Together with preclinical findings and a case report, these data support the interest of clinically testing  $\beta_2$ -agonists as potential treatment for neuropathic pain. A clinical randomized double-blind placebo-controlled trial was now initiated in Strasbourg and Besançon (France) to assess the efficacy of terbutaline on post-thoracotomy neuropathic pain and on diabetic neuropathic pain (NCT01582646 [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov)).

Figure 1 Diagram of study recruitment



**Table 1** Peri-operative characteristics of 189 patients without or with chronic pain (neuropathic or non-neuropathic pain)

	Painless n=108	Neuropathic n=58	Non-neuropathic n=23	<i>p</i>
Age <sup>a</sup>	58.8 (12.3)	54.8 (11.5)	58.8 (12.1)	0.038
Gender (male / female)	81/27	34/24	18/5	0.060
Delay post-surgery in years <sup>a</sup>	4.6 (3.4)	3.9 (3.2)	4.7 (3.7)	0.429
Gabapentin pre-emptive (32.3%)	34	20	7	0.907
Type of surgery (major/minor) <sup>c</sup>	15/93	6/17	11/47	0.324
Epidural anaesthesia (66%)	72	36	17	0.588
Cancer (84.1%)	97	41	21	0.003 <sup>b</sup>
Chemotherapy (9.5%)	7	6	5	0.075
Chronic inhaled $\beta_2$ -agonists (28.6%)	40	6	8	0.001 <sup>b</sup>
Chronic steroids (16.4%)	24	5	2	0.044
Chronic benzodiazepines (15.9%)	16	14	0	0.025
Chronic $\beta$ -blockers (10%)	13	4	2	0.054
Chronic opioids (6.3%)	4	8	0	0.016
Chronic antidepressants (4.8%)	3	6	0	0.048
Chronic anticonvulsants (4.2%)	5	3	0	0.553

Results are expressed as n (or mean  $\pm$  SD for the delay and age in years)

Chi-square test or ANOVA<sup>a</sup> were used to compare groups Painless/Neuropathic/Non-neuropathic.

<sup>b</sup> Variables with a significant correlation ( $p < 0.05$ ) were analysed on a multivariate regression: only cancer and chronic inhaled  $\beta_2$ -agonists were independent predictive factors associated with neuropathic pain incidence.

<sup>c</sup> Pneumectomy and bilobectomy are considered as extensive surgical procedures (major surgery). Lobectomy, segmentectomy, wedge resection, biopsy and other procedures are minor surgical procedures.

**Table 2**  $\beta_2$ -agonist treatment in patients with or without chronic pain (neuropathic or non-neuropathic) and mean pain intensity

Treatment	Painless	Neuropathic pain	Non-neuropathic pain
No $\beta_2$ -agonist (n=135)	68 (50%)	52 (39%) NSS=4.63 $\pm$ 1.2	15 (11%) NSS=4.67 $\pm$ 1.1
With $\beta_2$ -agonists (n=54)	40 (74%)	6 (11%) NSS=4.67 $\pm$ 1.5	8 (15%) NSS=4.63 $\pm$ 1.8
Odd Ratio Painful vs. painless Intervals of Confidence	/	0.19 [0.06 – 0.45]	0.91 [0.35 – 2.36]

NSS: mean Numeric Scale Score of pain and standard deviation

**Table 3** Adjustment of the  $\beta_2$ -agonists effect on clinical characteristics with a binomial logistic regression

Characteristics	Type of pain vs painless	Odd Ratio	Intervals of Confidence	p
Age	Neuropathic	0.98	[0.96 - 1.01]	0.061
	Non-neuropathic	1	[0.96 - 1.04]	
Gender	Neuropathic	2.18	[1.07 - 4.44]	0.0656
	Non-neuropathic	0.84	[0.28 - 2.47]	
Delay post-surgery	Neuropathic	0.94	[0.85 - 1.04]	0.417
	Non-neuropathic	1.04	[0.89 - 1.15]	
Gabapentine pre-emptive	Neuropathic	0.93	[0.46 - 1.88]	0.977
	Non-neuropathic	0.93	[0.35 - 2.52]	
Epidural anaesthesia	Neuropathic	0.84	[0.42 - 1.67]	0.621
	Non-neuropathic	1.42	[0.52 - 3.91]	
Extent of surgery	Neuropathic	1.39	[0.58 - 3.36]	0.366
	Non-neuropathic	2.18	[0.74 - 6.42]	
Chemotherapy	Neuropathic	1.41	[0.44 - 4.52]	0.118
	Non-neuropathic	4.01	[1.14 - 14.17]	
Chronic steroids	Neuropathic	0.90	[0.07 - 0.62]	0.227
	Non-neuropathic	0.26	[0.05 - 1.39]	
Chronic $\beta$ -blockers	Neuropathic	0.47	[0.14 - 1.55]	0.420
	Non-neuropathic	0.69	[0.14 - 3.28]	
Chronic opioids				NS <sup>a</sup>
Chronic antidepressants				NS <sup>a</sup>
Chronic anticonvulsants				NS <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Non-Significant: no estimation was available since the logistic regression algorithm did not converge, due to a lack of data in some variables combinations.

**Table 4** Type of pain and propensity score

<b>Propensity-score adjusted type of pain as a function of <math>\beta_2</math>-agonist treatment <math>p = 0.02</math> (propensity score <math>p = 0.158</math>)</b>		
189 patients	Neuropathic pain	Non-neuropathic pain
Propensity score	1.04 [0.18 - 5.87]	0.12 [0.01 - 1.29]
Odd Ratio Painful vs painless Intervals of Confidence	0.19 [0.06 - 0.60]	1.66 [0.55 - 4.99]
<b>Propensity-score adjusted type of pain as a function of <math>\beta_2</math>-agonist treatment <math>p = 0.02</math> for patients with cancer (propensity score <math>p = 0.146</math>)</b>		
159 cancer patients	Neuropathic pain	Non-neuropathic pain
Propensity score	0.34 [0.03 - 3.34]	0.12 [0.01 - 1.35]
Odd Ratio Painful vs painless Intervals of Confidence	0.21 [0.05 - 0.87]	1.73 [0.53 - 5.69]

**Table 5**  $\beta_2$ -agonist treatments and incidence of chronic post-thoracotomy pain in all patients who underwent a lobectomy for cancer (n=106) and in patients recently operated only (lobectomy for cancer between 2003 and 2009, n=73) (Neurop. = neuropathic pain, Non-neurop = non-neuropathic pain)

Lobectomy for cancer	106 patients 1995-2010			73 patients 2003-2009		
	Painless	Neurop.	Non-neur.	Painless	Neurop.	Non-neur.
No $\beta_2$ -agonists	40	23	10	28	15	6
With $\beta_2$ -agonists	29	1	3	21	1	2
<b>Odd Ratio</b> Painful vs. painless IC		<b>0.06</b> 0.01-0.47	<b>0.41</b> 0.1-1.62		<b>0.09</b> 0.01-0.74	<b>0.44</b> 0.08-2.4

**Table 6** Adjustment of the  $\beta_2$ -agonist effect on clinical characteristics with a binomial logistic regression in 106 patients who underwent lobectomy for cancer

Characteristics	Type of pain vs painless	Odd Ratio	Intervals of Confidence	p
Age	Neuropathic	0.97	[0.92 - 1.02]	0.357
	Non-neuropathic	1.00	[0.94 - 1.07]	
Gender	Neuropathic	1.66	[1.07 - 4.44]	0.623
	Non-neuropathic	1.47	[0.28 - 2.47]	
Delay post-surgery	Neuropathic	1.01	[0.85 - 1.04]	0.982
	Non-neuropathic	1.00	[0.89 - 1.15]	
Gabapentine pre-emptive	Neuropathic	1.30	[0.46 - 1.88]	0.877
	Non-neuropathic	1.09	[0.35 - 2.52]	
Epidural anaesthesia	Neuropathic	1.56	[0.42 - 1.67]	0.487
	Non-neuropathic	2.02	[0.52 - 3.91]	
Chronic steroids	Neuropathic	0.99	[0.15 - 6.56]	0.444
	Non-neuropathic	0.25	[0.02 - 2.61]	
Chronic $\beta$ -blockers	Neuropathic	0.70	[0.13 - 3.88]	0.816
	Non-neuropathic	1.40	[0.26 - 7.63]	
Chemotherapy	Neuropathic	0.54	[0.10 - 2.93]	0.322
	Non-neuropathic	2.43	[0.49 - 12.11]	
Chronic opioids				NS <sup>a</sup>
Chronic antidepressants				NS <sup>a</sup>
Chronic anticonvulsants				NS <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Non-Significant: no estimation was available since the logistic regression algorithm did not converge, due to a lack of data in some variables combinations.

**TableS1**  $\beta_2$ -agonists and steroids drugs chronically inhaled, and type of chronic pain

n	$\beta_2$ -agonist n°1 n=54	$\beta_2$ -agonist n°2 n=17	Neuropathic pain n=6	Non-neuropathic pain n=8	Associated inhaled steroids n=24
1	Fenoterol		no	no	
3	Formoterol		no	<b>yes</b>	
1	Formoterol		no	no	
2	Formoterol		<b>yes</b>	no	
1	Formoterol		no	<b>yes</b>	Beclomethasone
5	Formoterol		no	no	Budesonide
1	Formoterol		<b>yes</b>	no	Budesonide
1	Formoterol	Salbutamol	<b>yes</b>	no	
2	Formoterol	Salbutamol	no	no	
1	Formoterol	Salbutamol	no	<b>yes</b>	Beclomethasone
3	Formoterol	Salbutamol	no	no	Budesonide
1	Formoterol	Terbutaline	no	no	
6	Salbutamol		no	no	
1	Salbutamol		no	<b>yes</b>	
1	Salbutamol		<b>yes</b>	no	
3	Salbutamol		no	no	Beclomethasone
1	Salbutamol		<b>yes</b>	no	Beclomethasone
1	Salbutamol		no	no	Fluticasone
1	Salbutamol	Fenoterol	no	<b>yes</b>	
1	Salbutamol	Fenoterol	no	no	
1	Salbutamol	Pirbuterol	no	no	
2	Salmeterol		no	no	
1	Salmeterol		no	<b>yes</b>	
7	Salmeterol		no	no	Fluticasone
1	Salmeterol	Fenoterol	no	no	
1	Salmeterol	Formoterol	no	no	
1	Salmeterol	Salbutamol	no	no	
1	Salmeterol	Salbutamol	no	no	Fluticasone
2	Salmeterol	Terbutaline	no	no	

" $\beta_2$ -agonists n°1" refers to a daily  $\beta_2$ -agonist treatment

**FigureS1** Questionnaire (based on health records and on anamnesis) and clinical examination

1. Patient ID :
  - a. date of birth
  - b. gender
  - c. informed consent
2. Medical history:
  - a. diseases
  - b. history of neuropathic painful disorder? (if yes, patient excluded)
  - c. history of thoracic pain prior to surgery? (if yes, patient excluded)
  - d. thoracic surgical history:
    - i. operative reports  
(date and type of surgery and detailed narrative of what the surgeon did)
    - ii. history of the illness justifying the thoracic surgery
3. Medications:
  - a. current, previous and perioperative-period
  - b.  $\beta_2$ -agonist treatments:
    - i. name,
    - ii. regular or occasional use
    - iii. since when
    - iv. use in the perioperative period?
4. Pain at the scar level:
  - a. if yes: duration >2 months ?
  - b. daily average intensity (numeric scale)
  - c. neuropathic pain? Yes/No  
combination of DN4 score  $\geq 4$  and + sensitivity homo- vs contralateral (allodynia/hypoesthesia)



# DISCUSSION GÉNÉRALE

---

## Discussion générale

---

Mes travaux de thèse ont été réalisés sur 2 axes, clinique et préclinique. Notre étude clinique était inscrite dans la continuité des travaux de l'équipe du Dr Barrot, qui a montré chez l'animal que l'effet anti-allodynie des antidépresseurs passe par les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques. Il a ainsi été observé que les  $\beta_2$ -agonistes, utilisés en clinique dans le traitement de l'asthme, des bronchites chroniques obstructives et des menaces d'accouchement prématuré, ont un effet anti-allodynie identique aux antidépresseurs tricycliques et IRSNA chez la souris (Choucair-Jaafar et al., 2009; Yalcin et al., 2009b; Yalcin et al., 2009a; Yalcin et al., 2010). Pour étudier l'impact de la prise de  $\beta_2$ -agonistes sur les douleurs neuropathiques des patients, j'ai réalisé une enquête épidémiologique auprès de patients opérés d'une thoracotomie aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, décrite dans le chapitre précédent. Cette étude rétrospective montre une diminution significative de l'incidence des douleurs neuropathiques chroniques post-thoracotomie chez les patients sous traitement au long cours par  $\beta_2$ -agonistes.

Parallèlement, mes études précliniques m'ont permis de tester différents traitements sur des modèles murins de douleurs neuropathiques. En collaboration avec le Dr Choucair-Jaafar, j'ai testé l'efficacité d'un antidépresseur et d'un  $\beta_2$ -agoniste sur l'allodynie mécanique de souris diabétiques par déficience en leptine. En utilisant des antagonistes des récepteurs adrénergiques et opioïdiques en contretraitement de la nortriptyline ou de la terbutaline, j'ai montré que l'efficacité de ces traitements passe par les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques et nécessite la présence des récepteurs  $\delta$  des opioïdes, comme cela avait été observé dans le modèle du cuff (Benbouzid et al., 2008b).

En utilisant le modèle du cuff, caractérisé chez la souris dans notre laboratoire (Benbouzid et al., 2008a), j'ai testé des molécules de classes pharmacologiques différentes, antiépileptique, antidépresseur et anti-hyperalgésique. En fonction de la période de traitement, j'ai montré que les molécules recommandées dans le traitement des douleurs neuropathiques chez l'homme ont un effet similaire sur l'allodynie chronique des animaux neuropathiques. Les antidépresseurs tricycliques et IRSNA, la gabapentine et la carbamazépine ont un effet « antalgique » chez les

souris allodyniques qui apparaît après plusieurs jours de traitement et disparaît après l'arrêt de celui-ci. Il en est de même lors d'un traitement par un corticostéroïde, la dexaméthasone et un antagoniste NMDA, la kétamine. Comme attendu au regard de la clinique, un antidépresseur de type IRSS n'a aucun effet sur l'allodynie observée chez les souris. Si le traitement par les mêmes molécules est démarré 1 heure avant la chirurgie de pose du cuff, j'ai montré que les résultats sont radicalement différents. Hormis la kétamine, aucune de ces molécules n'a un effet sur l'allodynie évaluée les premiers jours la chirurgie, malgré ce traitement précoce. Par contre, l'évaluation au long cours des animaux traités par la gabapentine et la carbamazépine montre une diminution lente et progressive de l'allodynie, à distance du traitement précoce. A terme, un retour aux valeurs de base des seuils de sensibilité évalués avec les filaments de von Frey. Ce traitement a donc eu un effet préventif sur la chronicisation de l'allodynie. Un effet similaire, mais sensiblement moins marqué, est observé avec un traitement précoce par la terbuthaline. Tous les antidépresseurs, la kétamine et la dexaméthasone, instaurés précocement n'ont pas empêché la chronicisation de l'allodynie. Ce travail souligne l'intérêt de poursuivre des essais sur un traitement préventif chez l'homme, en particulier dans le cas des douleurs neuropathiques post-chirurgicales. La durée du traitement reste à déterminer, mais celui-ci devrait démarrer avant l'intervention et se prolonger suffisamment pour empêcher la mise en place des mécanismes de chronicisation.

#### **A. Limites méthodologiques des travaux précliniques**

Un regard critique de clinicien sur les modèles animaux utilisés dans ces travaux amène quelques réflexions. Dans le modèle du cuff comme dans les autres modèles de lésion du nerf sciatique, la chirurgie qui induit la lésion nerveuse est programmée et les caractéristiques des manifestations neuropathiques de l'animal sont connues et reproductibles. Cela permet d'avoir un contrôle très précis sur la période de traitement, son début et sa durée, par rapport au moment du mécanisme lésionnel. Il est donc possible d'étudier l'effet d'un traitement sur une symptomatologie installée. Mais ces modèles se prêtent aussi bien à l'étude des modalités de traitements à visée préventive, en anticipant les manifestations neuropathiques par le début d'un traitement en période pré- ou périopératoire.

Ce type d'étude est congruent avec l'étude du traitement préventif des douleurs neuropathiques chroniques post-chirurgicales chez l'homme. Cependant, toutes les neuropathies douloureuses chez l'homme ne sont pas d'origine traumatique et certaines neuropathies se mettent en place de façon lente et progressive. Pour étudier l'effet des traitements sur les douleurs neuropathiques, il est donc important de pouvoir disposer de modèles animaux mimant les différentes conditions étiopathogéniques chez l'homme. Dans notre étude de l'effet de la dextrobutaline sur l'allodynie neuropathique, le modèle de polyneuropathie diabétique chez la souris a permis de montrer les mêmes résultats que nos travaux antérieurs, réalisés sur un modèle symptomatique de lésion sciatique unilatérale. La conformité des résultats dans ces deux différents modèles confirme l'efficacité de la dextrobutaline sur l'allodynie neuropathique, tant d'origine traumatique que métabolique, et apparaît comme un point fort.

### **1. Limite des tests nociceptifs**

Une des limites de mes travaux réside dans le mode d'évaluation de la neuropathie. En effet, le critère d'évaluation principal de l'ensemble de mes travaux précliniques est le seuil de sensibilité mécanique mesuré avec des filaments de von Frey. Or cette modalité sensitive est également explorée chez l'homme, tant en pratique médicale qu'en recherche clinique. Mais il ne s'agit là que de l'une des composantes symptomatiques des neuropathies, et l'allodynie mécanique statique n'est pas la principale plainte exprimée par les patients. Dans mon expérience personnelle de médecin de la douleur, c'est la douleur spontanée, continue ou paroxystique, que les patients neuropathiques décrivent comme la plus gênante et qui motive le recours à une consultation médicale. En effet, tant dans la plainte des patients que dans les critères principaux des essais cliniques, c'est l'intensité de la douleur spontanée qui est au premier plan. De plus, il n'apparaît pas chez les patients interrogés par questionnaire de corrélation entre l'intensité des douleurs évoquées, thermique ou mécanique, et l'intensité de la douleur spontanée (Backonja and Stacey, 2004). Ce décalage entre les plaintes des patients douloureux et les critères d'évaluation pose le problème de la pertinence clinique des modèles animaux. La majorité des études précliniques repose sur l'évaluation de

la sensibilité mécanique ou thermique comme critère d'efficacité des molécules testées (Mogil and Crager, 2004). En recherche clinique les seuils de sensibilité, lorsqu'ils sont mesurés, le sont à l'heure actuelle en tant que critères secondaires (Attal et al., 2011) et c'est l'intensité de la douleur spontanée qui reste le critère d'évaluation principale. Différents tests du comportement de l'animal sont à l'étude, comme le test de préférence de place, pour tenter d'évaluer indirectement les douleurs spontanées de l'animal (King et al., 2009; Perrie du Sert and Rice, 2014).

## **2. Limites du modèle de douleur neuropathique**

Au-delà du mode d'évaluation de la symptomatologie neuropathique, d'autres décalages peuvent être constatés entre les modèles animaux et la réalité clinique. D'une part les patients douloureux neuropathiques se présentent à nous avec des antécédents et une histoire douloureuse chronique. Contrairement aux modèles animaux, le délai entre la survenue de douleurs neuropathiques et la mise en route d'un traitement spécifique peut être très long chez l'homme. Ce délai s'exprime en mois/années contrairement aux quelques jours chez les animaux. Dans le modèle du cuff comme dans plusieurs autres modèles neuropathiques, la symptomatologie est limitée dans le temps et spontanément résolutive à terme. Ensuite, la chronicité de ces douleurs neuropathiques a chez les patients un impact sur l'humeur et affecte les relations du patient avec son entourage (Meyer-Rosberg et al., 2001). Les recommandations de recherche clinique sur la douleur chronique chez l'homme préconisent d'évaluer les effets d'un traitement sur les différentes composantes de la douleur ainsi que sur la qualité de vie et la tolérance des effets secondaires (Dworkin et al., 2005). Parmi certains de ces facteurs, certains devraient pouvoir être évalués en routine lors de nos études précliniques. L'anxiété et la dépression (Yalcin et al., 2011), l'interaction sociale et le comportement des animaux (Benbouzid et al., 2008a) ont été caractérisés dans notre modèle d'étude. Il serait intéressant de pouvoir associer en routine l'étude préclinique de l'effet d'un traitement sur les douleurs spontanées et évoquées mais aussi et en parallèle les effets d'un tel traitement sur les composantes émotionnelles des douleurs neuropathiques chroniques.

## **B. Prévention des douleurs neuropathiques chroniques post-chirurgicales**

Un autre aspect de mon travail de thèse est celui de la prévention des douleurs neuropathiques. Les difficultés rencontrées pour soulager efficacement les patients douloureux neuropathiques chroniques font voir la prévention comme un élément clef, en particulier dans les situations programmées d'iatrogénie (chirurgie, chimiothérapie, toxicité médicamenteuse). Cette stratégie thérapeutique met également en exergue la nécessité d'identifier des facteurs de risques de développer une douleur neuropathique, afin de pouvoir cibler la prévention.

Tous les patients opérés d'une thoracotomie selon une procédure identique ne présenteront pas de douleurs neuropathiques. Limiter un traitement médicamenteux préventif à une population à risque de douleurs chroniques nous permet donc d'éviter une iatrogénie supplémentaire. Les études cliniques des facteurs prédictifs de douleurs neuropathiques chroniques post-chirurgicales sont d'un intérêt majeur et le contexte de chirurgie programmée se prête à de telles investigations longitudinales, prospectives ou rétrospectives. Les facteurs associés à un risque de douleurs chroniques post-chirurgicales sont nombreux et nous les citons succinctement.

### **1. En période pré-opératoire**

La durée et l'intensité des douleurs antérieures favorisent la chronicisation des douleurs post-opératoires, quelle que soit la chirurgie et indépendamment de la topographie des douleurs (Ong et al., 2005; Kehlet et al., 2006; Gerbershagen et al., 2009). De même, le recours aux antalgiques pour des douleurs antérieures est un facteur prédictif de douleurs chroniques (Katz et al., 2005). Cette consommation est d'une part une conséquence des douleurs antérieures mais également un facteur propre de chronicisation lorsqu'il s'agit de morphiniques (Angst and Clark, 2006). La génétique est un élément fondamental dans cette situation puisqu'elle conditionne la perception de la douleur (Diatchenko et al., 2013; Borsov et al., 2014) mais aussi la réponse aux antalgiques (Zubietta et al., 2003; Norbury et al., 2007). Le sexe féminin semble être un facteur de risque de développer des douleurs post-opératoires

(Buchanan et al, 2011) mais l'association avec des douleurs neuropathiques chroniques post-chirurgicales est peu documentée (Borsook et al, 2013). L'âge avancé lors de l'intervention est un facteur aggravant comme le démontre l'incidence des douleurs post-thoracotomies de l'enfant (Kristensen et al, 2010). Le statut psychologique et cognitif est également considéré comme prédictif de douleurs chroniques. L'anxiété, la dépression ou le catastrophisme avant une opération sont corrélés avec l'apparition de douleurs chroniques (Hinrichs-Rocker et al, 2009). Des troubles des performances cognitives, de la mémoire et de l'attention, sont significativement associés avec la présence de douleurs chroniques post-chirurgicales (Attalet al, 2014).

## **2. Au cours de la période peropératoire**

Le geste chirurgical et l'anesthésie sont les principaux éléments déterminants. Le type de chirurgie et le risque de lésion nerveuse associé sont reconnus comme des facteurs aggravants (Haroutiunian et al, 2013; Martinez et al, 2013). Par contre, les modalités d'anesthésie ont surtout démontré leur impact sur les douleurs aiguës post-opératoires et la consommation d'antalgiques (Ong et al, 2005). La répercussion à long terme sur le risque de survenue de douleurs chroniques, en particuliers neuropathiques, est peu démontrée. Une étude récente d'une analgésie par voie épidurale instaurée 48 heures avant et poursuivie 48 heures après une amputation permet de diminuer l'incidence des douleurs du membre fantôme à 6 mois (Karanikolas et al, 2011).

### 3. En période post-opératoire

Ce sont les phénomènes d'hyperalgésie et l'intensité de la douleur aiguë qui sont associés à une augmentation des douleurs chroniques (Eisenach, 2006; Salengros et al., 2010) aussi bien que l'usage de morphiniques (van Gulik et al., 2012). Le caractère neuropathique des douleurs, l'anxiété et les troubles du sommeil en période post-opératoire sont également reconnus comme des facteurs de risques de chronicisation des douleurs (Mamie et al., 2004; Katz et al., 2005; Maguire et al., 2006).

Une meilleure connaissance des facteurs prédictifs doit permettre une identification des patients à risque de douleurs neuropathiques chroniques post-chirurgicales. Une adaptation du geste chirurgical et de la prise en charge analgésique en fonction du risque évalué pour chaque patient est alors possible. Mais cela pourrait également permettre de mieux comprendre et d'anticiper la survenue de douleurs chroniques dans d'autres pathologies potentiellement génératrices de douleurs neuropathiques. Pour cela, il faut poursuivre la pratique d'enquêtes, de préférence prospectives, ou d'essais cliniques sur les douleurs chroniques post-chirurgicales. L'idéal serait des études d'une durée suffisamment longue, démarrant en période préopératoire et se poursuivent au moins 6 mois après la chirurgie. A l'instar de Kehlet et Rathmell, il nous apparaît évident que le design idéal d'une étude des douleurs neuropathiques post-chirurgicales intègre des informations des périodes pré-, per et post-opératoires et se prolonge par un suivi d'au moins 6 mois (Kehlet and Rathmell, 2010). En période pré-opératoire, il faut évaluer les caractéristiques des douleurs préexistantes et leurs conséquences, les traitements en cours et leur ancienneté d'administration, connaître le statut neurophysiologique et psychosocial du patient et rechercher un génotype « douloureux ». Les données du compte-rendu opératoire sont à intégrer à l'étude, avec des informations sur les gestes à risque de lésion nerveuse (incision, section, étirement).

A terme, sur la base des résultats des études ainsi réalisées, une forme de « dépistage » des patients à risque de développer une douleur neuropathique chronique pourrait se concevoir dans une consultation pré-anesthésique et si nécessaire entraîner de fait une prise en charge analgésique personnalisée puis d'un suivi post-opératoire adapté.



### **C. Impact d'un traitement préventif par antiépileptiques sur la douleur neuropathique : aspects cliniques**

Notre travail montre qu'un traitement par gabapentine ou par carbamazépine administré avant la chirurgie du cuff et maintenu pendant une dizaine de jour n'empêche pas la survenue d'une allodynie mécanique. Cependant, la poursuite des tests par des filaments de von Frey montre un retour progressif des seuils de sensibilité aux valeurs des lignes de base. Cet effet préventif de la chronicisation de l'allodynie par lésion nerveuse suggère une action de la gabapentine et de la carbamazépine sur les mécanismes qui sous-tendent la pérennisation des douleurs neuropathiques dans ce modèle. Pourtant ces deux molécules, qui appartiennent à la même classe des antiépileptiques, ont des mécanismes d'action différents.

#### ***1. Gabapentine et canaux calcium***

La gabapentine, comme la prégabaline, se lie aux sous-unités  $\alpha 2\delta 1$  des canaux calcium voltage-dépendants dont elle va modifier le transport vers les terminaisons présynaptiques (Hendrich et al., 2008; Bauer et al., 2009). En condition neuropathique, un traitement par gabapentine entraîne une diminution de la libération de glutamate et de substance P par les terminaisons des nocicepteurs (Takasusuki and Yaksh, 2011). Ce mécanisme peut expliquer l'impact d'un traitement par gabapentine sur les phénomènes de sensibilisation. En diminuant les influx nociceptifs qui arrivent dans la corne dorsale suite à la lésion nerveuse, la gabapentine diminue la sensibilisation centrale. Le blocage de cette sensibilisation est une explication possible à l'effet préventif sur la chronicisation de l'allodynie.

#### ***2. Carbamazépine et canaux sodium***

La carbamazépine a un mécanisme d'action principal différent de la gabapentine. La cible principale de la carbamazépine sont les canaux sodium voltage-dépendants. Un traitement par carbamazépine diminue la fréquence des décharges ectopiques en bloquant les canaux sodium.

Mais cette molécule a également d'autres mécanismes d'action observés sur le système nerveux central. La carbamazépine a un effet d'inhibition de la libération de glutamate et un effet bloquant des canaux calcium voltage-dépendants (Ambrosio et al, 2002). Instauré comme traitement préventif, la carbamazépine a donc probablement le même impact sur les conséquences d'une lésion nerveuse en freinant la sensibilisation centrale. Cette hypothèse a également motivé les travaux sur l'utilisation locale préventive de la lidocaïne, un autre bloquant des canaux sodium voltage-dépendants. Certains auteurs ont montré l'effet préventif de la lidocaïne sur l'hyperalgésie dans le modèle du CCI (Sotgiu et al, 1995).

### ***3. Gabapentine, carbamazépine et activation gliale***

Les cellules gliales et leurs interactions avec les neurones exercent un rôle important dans le développement et la chronicisation des douleurs neuropathiques (Ji et al, 2013). Une lésion nerveuse périphérique est associée à une activation des cellules de Schwann autour du nerf endommagé, une activation des cellules satellites du ganglion rachidien correspondant et des cellules microgliales et astrocytaires dans la corne dorsale (Calvo et al, 2012). Dans les heures qui suivent une lésion nerveuse périphérique, les premières cellules non-neuronales à être activées dans la corne dorsale sont les cellules microgliales (Tanga et al, 2004). Ces cellules immunitaires du système nerveux central sont associées à l'apparition des symptômes neuropathiques comme l'allodynie ou l'hyperalgésie (Clark et al, 2007). Les cellules microgliales peuvent ensuite rester activées pendant plusieurs semaines et des phénomènes de libération de substances pro-inflammatoires sont observés autour des terminaisons des afférences nociceptives. La libération de cytokines comme le TNF- $\alpha$ , les Interleukines-1 $\alpha$  et -1 $\beta$  participe au développement de l'allodynie et de l'hyperalgésie (Boddeke, 2001; DeLeo and Yezierski, 2001). Les astrocytes sont des cellules activées plus tardivement et impliquées dans la pérennisation des douleurs neuropathiques (Colum et al, 1999; Mika et al, 2009). L'activation des astrocytes apparaît 4 jours après l'activation des cellules microgliales et persiste jusqu'à 12 semaines après la lésion nerveuse. Cette activation est observée dans la plupart des modèles de lésion du nerf sciatique (Liu et al, 2000; Tsuda et al, 2011). Une fois activée, ces cellules libèrent à leur tour des substances

inflammatoires et permettent le maintien des symptômes neuropathiques (Ji et al, 2013). Le déroulement chronologique de ces mécanismes suggère que l'initiation de l'allodynie neuropathique par lésion nerveuse implique la participation des cellules microgliales, alors que la persistance de l'allodynie fait intervenir les astrocytes (Mika et al, 2013).

Il est intéressant de noter que dans la physiopathologie de l'épilepsie, l'activation des cellules microgliales et des astrocytes témoigne de la production de cytokines pro-inflammatoires. Or une étude récente montre *in vitro* un effet d'inactivation des astrocytes et des cellules microgliales par l'administration de carbamazépine dans une culture de cellules cérébrales de rats nouveau-nés (Dambach et al, 2014). Il est également intéressant d'observer l'association de l'effet anti-allodynique et de réduction de l'activité microgliale de la corne dorsale lors d'un traitement par gabapentine dans un modèle de rats diabétiques (Wodarski et al, 2009). Ces travaux sont donc en faveur d'un impact des traitements antiépileptiques sur l'activité gliale dans les douleurs neuropathiques.

Au niveau périphérique, le nerf sciatique lésé puis le ganglion rachidien correspondant sont envahis dès les premiers jours qui suivent la chirurgie par des polynucléaires neutrophiles et des macrophages (Kim and Moalem-Taylor, 2011). En réponse à une lésion nerveuse, il est également observé dès les premières heures une réaction des cellules satellites du ganglion rachidien, avec un pic dans la première semaine puis une décroissance progressive en 3 semaines (Liu et al, 2012). Enfin, des cellules dendritiques et des lymphocytes sont observés dans le nerf lésé et le ganglion rachidien à 7 et 14 jours après la chirurgie du nerf sciatique. L'observation de ces mécanismes neuro-immunitaires dans les heures et les jours qui suivent la chirurgie de lésion du nerf sciatique suggère leur implication potentielle dans la prévention de la chronicisation des douleurs neuropathiques par un traitement précoce et pose la question de l'interaction des antiépileptiques avec ces mécanismes neuro-immunitaires précoces.

Dans une étude récente, le traitement des douleurs neuropathiques par une administration intrathécale de prégabaline, un autre gabapentinoïde, a été étudié dans le modèle du SNI chez le rat (Yang et al, 2014). Ce traitement chronique démarrait le jour de la chirurgie et était maintenu pendant 4 semaines. Les tests avec des filaments de von Frey ne montraient pas d'allodynie durant la période de

traitement. Par contre, les animaux traités présentaient une rechute après l'arrêt du traitement. Ce traitement n'a pas eu d'effet préventif sur la chronicisation. Les auteurs ont également constaté, durant le traitement, la présence de marqueurs d'une activation des cellules microgliales dans la corne dorsale. Ils n'ont pas non plus observé d'effet de ce traitement sur la concentration en sous-unités  $\alpha 2\delta 1$  dans les terminaisons des afférences primaires. L'ensemble de ces observations suggère l'absence d'effet médullaire de la prégabaline. D'autres études vont dans le sens d'une efficacité incomplète de l'injection intrathécale de gabapentinoïdes et la persistance d'une activation lors d'une lésion nerveuse (Martinez et al., 2012a; Morimoto et al., 2012). Il est probable que l'administration systémique de gabapentinoïdes soit plus efficace, en prévention des douleurs neuropathiques, par l'obtention de concentrations plus élevées au niveau du ganglion rachidien. Cela nous amène à émettre l'hypothèse d'un rôle clef du ganglion rachidien dans les mécanismes de chronicisation des douleurs neuropathiques.

**D. Travaux en cours et perspectives: Bêta pain  
étude de l'effet antalgique des  $\beta_2$ -agonistes sur les douleurs  
neuropathiques post-chirurgie thoracique**

Dans la continuité des travaux précliniques et épidémiologiques, nous avons conçu un projet de recherche clinique. Il s'agit d'un essai clinique randomisé contrôlé visant à évaluer l'effet antalgique des  $\beta_2$ -agonistes sur les douleurs neuropathiques. Ce projet a été soumis et accepté dans le cadre d'un Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) interrégional en 2010 sous le numéro ID RCB2010-020078-40. Avec pour promoteur les Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS) et en collaboration avec le Centre d'Investigation Clinique (CIC), cette étude est répartie sur 2 centres hospitaliers universitaires : Strasbourg et Besançon.

**1. Les objectifs et critères d'évaluation**

L'objectif principal est l'étude de l'effet antalgique de la terbuthaline sur des douleurs neuropathiques post-thoracotomie. Le critère d'évaluation principal est l'intensité moyenne de la douleur des dernières 24 heures rapportée par le patient

sur une Echelle Numérique en 11 points (EN). Les objectifs secondaires sont d'évaluer les effets de la terbutaline sur les différentes composantes des douleurs neuropathiques. L'évolution de l'intensité moyenne de la douleur ressentie par les patients au cours de 14 jours de traitement précédant chaque visite médicale est appréciée par la tenue quotidienne d'un agenda. L'évolution des différents symptômes douloureux neuropathiques est évaluée par le NPSI. L'évaluation quantitative de l'impact du traitement sur les seuils de sensibilité mécanique est effectuée par l'utilisation de filaments de von Frey. L'allodynie mécanique dynamique est évaluée en frottant la zone douloureuse avec une brosse (Somedic Sales, Horby, Suède). L'évaluation quantitative de l'impact du traitement sur les seuils de sensibilité thermique est réalisée grâce à l'utilisation d'un Roltemp (Senselab, Roltemp, Somedic Sales, Horby, Suède).

## ***2. Plan expérimental***

Il s'agit d'une étude bi-centrique, comparant la terbutaline contre un placebo, randomisée, en double-aveugle et croisée. Les patients inclus présentent des douleurs neuropathiques post-chirurgie thoracique (thoracotomie ou thoracoscopie) depuis plus de 3 mois. Les critères de non-inclusion sont ceux liés aux précautions d'emploi des  $\beta_2$ -agonistes ou concernant le traitement des patients.

## ***3. Déroulement pratique de l'essai***

Après la visite de sélection, le patient est affecté de façon randomisée à un ordre de séquence thérapeutique : traitement par terbutaline ou par placebo en 1<sup>ère</sup> ou 2<sup>nde</sup> période. Chaque période de traitement dure 4 semaines, séparée par un intervalle libre (wash-out) de 2 semaines. Une visite médicale est prévue en début de traitement, à mi-course et une en fin de traitement pour chaque période. Une dernière visite de suivi (follow-up) a lieu 2 semaines après la fin de la deuxième et dernière période de traitement. Le médicament expérimental est le Bricanyl® 5 mg LP administré à raison d'une gélule matin et soir tous les jours pendant 4 semaines. Le schéma d'administration est le même pour le placebo qui revêt une apparence strictement identique au médicament testé.

#### **4. Etat d'avancement de l'essai**

Le recrutement des patients pour Bêtapain se fait lors de la consultation du Centre d'Evaluation et de Traitement de la Douleur pour des patients adressés par les consultations de Chirurgie Thoracique ou de Pneumologie. En raison des difficultés de recrutement de patients qui répondent aux critères d'inclusion, différentes stratégies ont été adoptées en collaboration avec le CIC. Dans un premier temps, nous avons sollicités tous les patients opérés aux HUS d'une thoracotomie au cours des 3 dernières années. Un courrier a été adressé aux patients pour leur proposer de participer à notre étude, en cas de douleurs au niveau de la zone thoracique opérée. Puis nous avons procédé à une modification du protocole expérimental. Au regard des résultats de nos travaux précliniques et dans l'objectif d'augmenter le nombre de patients potentiels à inclure, nous avons élargi le recrutement aux patients diabétiques avec des douleurs neuropathiques des membres inférieurs. Les critères d'éligibilité et de surveillance ont été modifiés pour sécuriser la prise d'un traitement par terbutaline par des patients diabétiques. En effet, les propriétés  $\beta_2$ -agonistes de la terbutaline sont susceptibles de modifier à la hausse les valeurs de glycémie mesurée et d'entraîner une inadaptation du traitement. L'ensemble des modifications a fait l'objet d'un amendement et l'accord de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) et du Comité de Protection de Personnes (CPP) ont été obtenus. Les premiers patients diabétiques devaient être inclus au cours de l'année 2014.

# **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

---

## Conclusion et perspectives

---

Ce travail de recherche, réalisé dans le cadre de ma thèse, s'inscrit dans une approche translationnelle. Notre pratique clinique nous a permis de constater l'effet thérapeutique des antidépresseurs tricycliques et IRSNA sur les douleurs neuropathiques. Des études précliniques ont montré, en décomposant le mécanisme d'action de ces antidépresseurs dans un modèle murin de neuropathie traumatique, que cet effet thérapeutique passe par les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques. Nous avons étudié l'effet d'un traitement par un  $\beta_2$ -agoniste, la terbutaline, dans un modèle murin de neuropathie métabolique. Nous avons montré l'efficacité de la terbutaline, comme de la nortriptyline, dans le traitement de l'allodynie mécanique de souris diabétiques. Ce travail confirme ainsi l'efficacité de la terbutaline sur l'allodynie observée dans deux différents modèles de neuropathies. Nous avons ensuite réalisé, en clinique, une enquête rétrospective qui montre une diminution des douleurs neuropathiques chroniques post-thoracotomie chez les patients sous traitement au long cours par  $\beta_2$ -agonistes. En parallèle, nous avons étudié l'impact de la période de traitement sur l'allodynie chronique dans le modèle murin du cuff. Nous avons ainsi observé un effet préventif sur la chronicisation de l'allodynie par un traitement précoce avec de la gabapentine ou de la carbamazépine, et de la terbutaline dans une moindre mesure. Nos travaux actuels de recherche clinique mettent en application ces résultats. Un essai clinique randomisé contrôlé visant à évaluer la terbutaline dans le traitement des douleurs neuropathiques chroniques post-thoracotomie est en cours aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. Dans nos perspectives cliniques, nous envisageons d'étudier l'effet préventif des antiépileptiques sur la survenue de douleurs neuropathiques chroniques post-chirurgicales. Dans un tel essai, nous envisagerons l'administration *per os* d'un traitement démarré avant l'intervention et suffisamment prolongé pour pouvoir bloquer les mécanismes de chronicisation des douleurs neuropathiques. En préclinique, nous compléterons nos travaux sur l'effet préventif des antiépileptiques par l'étude de l'activité gliale associée aux phénomènes allodyniques dans le modèle du cuff chez la souris.



# **BIBLIOGRAPHIE**

---

- Ahlgren SC, Levine JD (1993) Mechanical hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats. *Neuroscience* 52:1049-1055.
- Aley KO, Levine JD (2001) Rapid onset pain induced by intravenous streptozotocin in the rat. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 2:146-150.
- Althaus A, Hinrichs-Rocker A, Chapman R, Arranz Becker O, Lefering R, Simanski C, Weber F, Moser KH, Joppich R, Trojan S, Gutzeit N, Neugebauer E (2012) Development of a risk index for the prediction of chronic post-surgical pain. *European journal of pain* 16:901-910.
- Ambrosio AF, Soares-Da-Silva P, Carvalho CM, Carvalho AP (2002) Mechanisms of action of carbamazepine and its derivatives, oxcarbazepine, BIA 2-093, and BIA 2-024. *Neurochemical research* 27:121-130.
- Ambrosio AF, Silva AP, Malva JO, Soares-da-Silva P, Carvalho AP, Carvalho CM (1999) Carbamazepine inhibits L-type Ca<sup>2+</sup> channels in cultured rat hippocampal neurons stimulated with glutamate receptor agonists. *Neuropharmacology* 38:1349-1359.
- Amir R, Kocsis JD, Devor M (2005) Multiple interacting sites of ectopic spike electrogenesis in primary sensory neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:2576-2585.
- Amr YM, Yousef AA (2010) Evaluation of efficacy of the perioperative administration of Venlafaxine or gabapentin on acute and chronic postmastectomy pain. *The Clinical journal of pain* 26:381-385.
- Andersen G, Vestergaard K, Ingeman-Nielsen M, Jensen TS (1995) Incidence of central post-stroke pain. *Pain* 61:187-193.
- Angst MS, Clark JD (2006) Opioid-induced hyperalgesia: a qualitative systematic review. *Anesthesiology* 104:570-587.
- Askmark H, Wiholm BE (1990) Epidemiology of adverse reactions to carbamazepine as seen in a spontaneous reporting system. *Acta neurologica Scandinavica* 81:131-140.
- Attal N, Bouhassira D (2006) Translating basic research on sodium channels in human neuropathic pain. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 7:S31-37.
- Attal N, Fermanian C, Fermanian J, Lanteri-Minet M, Alchaar H, Bouhassira D (2008) Neuropathic pain: are there distinct subtypes depending on the aetiology or anatomical lesion? *Pain* 138:343-353.
- Attal N, Cruccu G, Baron R, Haanpaa M, Hansson P, Jensen TS, Nurmikko T, European Federation of Neurological S (2010) EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 17:1113-e1188.
- Attal N, Masselin-Dubois A, Martinez V, Jayr C, Albi A, Fermanian J, Bouhassira D, Baudic S (2014) Does cognitive functioning predict chronic pain? Results from a prospective surgical cohort. *Brain : a journal of neurology* 137:904-917.
- Attal N, Cruccu G, Haanpaa M, Hansson P, Jensen TS, Nurmikko T, Sampaio C, Sindrup S, Wiffen P, Force ET (2006) EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 13:1153-1169.
- Attal N, Bouhassira D, Baron R, Dostrovsky J, Dworkin RH, Finnerup N, Gourlay G, Haanpaa M, Raja S, Rice AS, Simpson D, Treede RD (2011) Assessing symptom profiles in neuropathic pain clinical trials: can it improve outcome? *European journal of pain* 15:441-443.
- Backonja MM, Stacey B (2004) Neuropathic pain symptoms relative to overall pain rating. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 5:491-497.
- Baliki MN, Schnitzer TJ, Bauer WR, Apkarian AV (2011) Brain morphological signatures for chronic pain. *PloS one* 6:e26010.
- Baron R, Binder A, Wasner G (2010) Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet neurology* 9:807-819.
- Barrot M (2012) Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience* 211:39-50.

- Bauer CS, Nieto-Rostro M, Rahman W, Tran-Van-Minh A, Ferron L, Douglas L, Kadurin I, Sri Ranjan Y, Fernandez-Alacid L, Millar NS, Dickenson AH, Lujan R, Dolphin AC (2009) The increased trafficking of the calcium channel subunit alpha2delta-1 to presynaptic terminals in neuropathic pain is inhibited by the alpha2delta ligand pregabalin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:4076-4088.
- Beaudry F, Girard C, Vachon P (2007) Early dexamethasone treatment after implantation of a sciatic-nerve cuff decreases the concentration of substance P in the lumbar spinal cord of rats with neuropathic pain. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* 71:90-97.
- Bee LA, Dickenson AH (2008) Descending facilitation from the brainstem determines behavioural and neuronal hypersensitivity following nerve injury and efficacy of pregabalin. *Pain* 140:209-223.
- Beggs S, Salter MW (2010) Microglia-neuronal signalling in neuropathic pain hypersensitivity 2.0. *Current opinion in neurobiology* 20:474-480.
- Benbouzid M, Pallage V, Rajalu M, Waltisperger E, Doridot S, Poisbeau P, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2008a) Sciatic nerve cuffing in mice: a model of sustained neuropathic pain. *European journal of pain* 12:591-599.
- Benbouzid M, Gaveriaux-Ruff C, Yalcin I, Waltisperger E, Tessier LH, Muller A, Kieffer BL, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2008b) Delta-opioid receptors are critical for tricyclic antidepressant treatment of neuropathic allodynia. *Biological psychiatry* 63:633-636.
- Bennett GJ, Xie YK (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33:87-107.
- Bennett M (2001) The LANSS Pain Scale: the Leeds assessment of neuropathic symptoms and signs. *Pain* 92:147-157.
- Bennett MI, Attal N, Backonja MM, Baron R, Bouhassira D, Freynhagen R, Scholz J, Tolle TR, Wittchen HU, Jensen TS (2007) Using screening tools to identify neuropathic pain. *Pain* 127:199-203.
- Berta T, Poirot O, Pertin M, Ji RR, Kellenberger S, Decosterd I (2008) Transcriptional and functional profiles of voltage-gated Na(+) channels in injured and non-injured DRG neurons in the SNI model of neuropathic pain. *Molecular and cellular neurosciences* 37:196-208.
- Bialer M, Johannessen SI, Kupferberg HJ, Levy RH, Loiseau P, Perucca E (1999) Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the fourth Eilat conference (EILAT IV). *Epilepsy research* 34:1-41.
- Bian F, Li Z, Offord J, Davis MD, McCormick J, Taylor CP, Walker LC (2006) Calcium channel alpha2-delta type 1 subunit is the major binding protein for pregabalin in neocortex, hippocampus, amygdala, and spinal cord: an ex vivo autoradiographic study in alpha2-delta type 1 genetically modified mice. *Brain research* 1075:68-80.
- Bisgaard T, Rosenberg J, Kehlet H (2005) From acute to chronic pain after laparoscopic cholecystectomy: a prospective follow-up analysis. *Scandinavian journal of gastroenterology* 40:1358-1364.
- Black JA, Cummins TR, Plumpton C, Chen YH, Hormuzdiar W, Clare JJ, Waxman SG (1999) Upregulation of a silent sodium channel after peripheral, but not central, nerve injury in DRG neurons. *Journal of neurophysiology* 82:2776-2785.
- Blackburn-Munro G, Jensen BS (2003) The anticonvulsant retigabine attenuates nociceptive behaviours in rat models of persistent and neuropathic pain. *European journal of pharmacology* 460:109-116.
- Blom S (1962) Trigeminal neuralgia: its treatment with a new anticonvulsant drug (G-32883). *Lancet* 1:839-840.
- Boddeke EW (2001) Involvement of chemokines in pain. *European journal of pharmacology* 429:115-119.
- Bohren Y, Tessier LH, Megat S, Petitjean H, Hugel S, Daniel D, Kremer M, Fournel S, Hein L, Schlichter R, Freund-Mercier MJ, Yalcin I, Barrot M (2013) Antidepressants suppress neuropathic pain by a peripheral beta2-adrenoceptor mediated anti-TNFalpha mechanism. *Neurobiology of disease* 60:39-50.

- Borsook D, Kussman BD, George E, Becerra LR, Burke DW (2013) Surgically induced neuropathic pain: understanding the perioperative process. *Annals of surgery* 257:403-412.
- Bortsov AV, Diatchenko L, McLean SA (2014) Complex multilocus effects of catechol-O-methyltransferase haplotypes predict pain and pain interference 6 weeks after motor vehicle collision. *Neuromolecular medicine* 16:83-93.
- Bouhassira D, Letanoux M, Hartemann A (2013) Chronic pain with neuropathic characteristics in diabetic patients: a French cross-sectional study. *PloS one* 8:e74195.
- Bouhassira D, Lanteri-Minet M, Attal N, Laurent B, Touboul C (2008) Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain* 136:380-387.
- Bouhassira D, Attal N, Fermanian J, Alchaar H, Gautron M, Masquelier E, Rostaing S, Lanteri-Minet M, Collin E, Grisart J, Boureau F (2004) Development and validation of the Neuropathic Pain Symptom Inventory. *Pain* 108:248-257.
- Bouhassira D, Attal N, Alchaar H, Boureau F, Brochet B, Bruxelle J, Cunin G, Fermanian J, Ginies P, Grun-Overdyking A, Jafari-Schlupe H, Lanteri-Minet M, Laurent B, Mick G, Serrie A, Valade D, Vicaut E (2005) Comparison of pain syndromes associated with nervous or somatic lesions and development of a new neuropathic pain diagnostic questionnaire (DN4). *Pain* 114:29-36.
- Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, Malik RA, Maser RE, Sosenko JM, Ziegler D, American Diabetes A (2005) Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes care* 28:956-962.
- Bourquin AF, Suveges M, Pertin M, Gilliard N, Sardy S, Davison AC, Spahn DR, Decosterd I (2006) Assessment and analysis of mechanical allodynia-like behavior induced by spared nerve injury (SNI) in the mouse. *Pain* 122:14 e11-14.
- Brau ME, Dreimann M, Olschewski A, Vogel W, Hempelmann G (2001) Effect of drugs used for neuropathic pain management on tetrodotoxin-resistant Na(+) currents in rat sensory neurons. *Anesthesiology* 94:137-144.
- Brown MJ, Sumner AJ, Greene DA, Diamond SM, Asbury AK (1980) Distal neuropathy in experimental diabetes mellitus. *Annals of neurology* 8:168-178.
- Brownlee M (1994) Lilly Lecture 1993. Glycation and diabetic complications. *Diabetes* 43:836-841.
- Buchanan FF, Myles PS, Cicuttini F (2011) Effect of patient sex on general anaesthesia and recovery. *British journal of anaesthesia* 106:832-839.
- Callaghan BC, Hur J, Feldman EL (2012) Diabetic neuropathy: one disease or two? *Current opinion in neurology* 25:536-541.
- Calvo M, Bennett DL (2012) The mechanisms of microgliosis and pain following peripheral nerve injury. *Experimental neurology* 234:271-282.
- Calvo M, Dawes JM, Bennett DL (2012) The role of the immune system in the generation of neuropathic pain. *Lancet neurology* 11:629-642.
- Cameron NE, Cotter MA, Horrobin DH, Tritschler HJ (1998) Effects of alpha-lipoic acid on neurovascular function in diabetic rats: interaction with essential fatty acids. *Diabetologia* 41:390-399.
- Cameron NE, Eaton SE, Cotter MA, Tesfaye S (2001) Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia* 44:1973-1988.
- Carlton SM, Dougherty PM, Pover CM, Coggeshall RE (1991) Neuroma formation and numbers of axons in a rat model of experimental peripheral neuropathy. *Neuroscience letters* 131:88-92.
- Carrazana E, Mikoshiba I (2003) Rationale and evidence for the use of oxcarbazepine in neuropathic pain. *Journal of pain and symptom management* 25:S31-35.
- Catterall WA (2000) From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26:13-25.
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of neuroscience methods* 53:55-63.
- Chattopadhyay M, Mata M, Fink DJ (2011) Vector-mediated release of GABA attenuates pain-related behaviors and reduces Na(V)1.7 in DRG neurons. *European journal of pain* 15:913-920.

- Choucair-Jaafar N, Salvat E, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2014) The antiallodynic action of nortriptyline and terbutaline is mediated by beta(2) adrenoceptors and delta opioid receptors in the ob/ob model of diabetic polyneuropathy. *Brain research* 1546:18-26.
- Choucair-Jaafar N, Yalcin I, Rodeau JL, Waltisperger E, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2009) Beta2-adrenoceptor agonists alleviate neuropathic allodynia in mice after chronic treatment. *British journal of pharmacology* 158:1683-1694.
- Choucair-Jaafar N, Beetz N, Gilsbach R, Yalcin I, Waltisperger E, Freund-Mercier MJ, Monassier L, Hein L, Barrot M (2011) Cardiovascular effects of chronic treatment with a beta2-adrenoceptor agonist relieving neuropathic pain in mice. *Neuropharmacology* 61:51-60.
- Chung SS, Chung SK (2005) Aldose reductase in diabetic microvascular complications. *Current drug targets* 6:475-486.
- Clark AK, Gentry C, Bradbury EJ, McMahon SB, Malmangio M (2007) Role of spinal microglia in rat models of peripheral nerve injury and inflammation. *European journal of pain* 11:223-230.
- Cleeland CS, Ryan KM (1994) Pain assessment: global use of the Brief Pain Inventory. *Ann Acad Med Singapore* 23:129-138.
- Cok OY, Eker HE, Yalcin I, Barrot M, Aribogan A (2010) Is there a place for beta-mimetics in clinical management of neuropathic pain? Salbutamol therapy in six cases. *Anesthesiology* 112:1276-1279.
- Colburn RW, Rickman AJ, DeLeo JA (1999) The effect of site and type of nerve injury on spinal glial activation and neuropathic pain behavior. *Experimental neurology* 157:289-304.
- Colleoni M, Sacerdote P (2010) Murine models of human neuropathic pain. *Biochimica et biophysica acta* 1802:924-933.
- Collongues N, Blanc F, Echaniz-Laguna A, Boehm N, de Seze J (2009) [Confirmation of the use of skin biopsy in small-fiber neuropathy. First results]. *Rev Neurol (Paris)* 165:249-255.
- Coull JA, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, Sik A, De Koninck P, De Koninck Y (2003) Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 424:938-942.
- Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y (2005) BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438:1017-1021.
- Cox JJ, Reimann F, Nicholas AK, Thornton G, Roberts E, Springell K, Karbani G, Jafri H, Mannan J, Raashid Y, Al-Gazali L, Hamamy H, Valente EM, Gorman S, Williams R, McHale DP, Wood JN, Gribble FM, Woods CG (2006) An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* 444:894-898.
- Cummins TR, Sheets PL, Waxman SG (2007) The roles of sodium channels in nociception: Implications for mechanisms of pain. *Pain* 131:243-257.
- Cunningham MO, Woodhall GL, Thompson SE, Dooley DJ, Jones RS (2004) Dual effects of gabapentin and pregabalin on glutamate release at rat entorhinal synapses in vitro. *The European journal of neuroscience* 20:1566-1576.
- D'Mello R, Dickenson AH (2008) Spinal cord mechanisms of pain. *British journal of anaesthesia* 101:8-16.
- Dahl JB, Kehlet H (2011) Preventive analgesia. *Current opinion in anaesthesiology* 24:331-338.
- Dambach H, Hinkerohe D, Prochnow N, Stienen MN, Moinfar Z, Haase CG, Hufnagel A, Faustmann PM (2014) Glia and epilepsy: experimental investigation of antiepileptic drugs in an astroglia/microglia co-culture model of inflammation. *Epilepsia* 55:184-192.
- De Kock M, Lavand'homme P, Waterloos H (2001) 'Balanced analgesia' in the perioperative period: is there a place for ketamine? *Pain* 92:373-380.
- de Moraes Vieira EB, Garcia JB, da Silva AA, Muallem Araujo RL, Jansen RC (2012) Prevalence, characteristics, and factors associated with chronic pain with and without neuropathic characteristics in Sao Luis, Brazil. *Journal of pain and symptom management* 44:239-251.
- de Mos M, de Bruijn AG, Huygen FJ, Dieleman JP, Stricker BH, Sturkenboom MC (2007) The incidence of complex regional pain syndrome: a population-based study. *Pain* 129:12-20.

- Decosterd I, Woolf CJ (2000) Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87:149-158.
- DeLeo JA, Yezierski RP (2001) The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. *Pain* 90:1-6.
- Dennis R, O'Riordan D (2007) Risk factors for chronic pain after inguinal hernia repair. *Annals of the Royal College of Surgeons of England* 89:218-220.
- Deumens R, Steyaert A, Forget P, Schubert M, Lavand'homme P, Hermans E, De Kock M (2013) Prevention of chronic postoperative pain: cellular, molecular, and clinical insights for mechanism-based treatment approaches. *Progress in neurobiology* 104:1-37.
- Devor M (2006) Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 7:S3-S12.
- Diatchenko L, Fillingim RB, Smith SB, Maixner W (2013) The phenotypic and genetic signatures of common musculoskeletal pain conditions. *Nature reviews Rheumatology* 9:340-350.
- Dib-Hajj SD, Cummins TR, Black JA, Waxman SG (2010) Sodium channels in normal and pathological pain. *Annual review of neuroscience* 33:325-347.
- Dieleman JP, Kerklaan J, Huygen FJ, Bouma PA, Sturkenboom MC (2008) Incidence rates and treatment of neuropathic pain conditions in the general population. *Pain* 137:681-688.
- Dobler T, Springauf A, Tovornik S, Weber M, Schmitt A, Sedlmeier R, Wischmeyer E, Doring F (2007) TRESK two-pore-domain K<sup>+</sup> channels constitute a significant component of background potassium currents in murine dorsal root ganglion neurones. *The Journal of physiology* 585:867-879.
- Dogra S, Beydoun S, Mazzola J, Hopwood M, Wan Y (2005) Oxcarbazepine in painful diabetic neuropathy: a randomized, placebo-controlled study. *European journal of pain* 9:543-554.
- Dolgin E (2010) Animalgesic effects. *Nature medicine* 16:1237-1240.
- Dolphin AC (2012) Calcium channel auxiliary alpha2delta and beta subunits: trafficking and one step beyond. *Nature reviews Neuroscience* 13:542-555.
- Dolphin AC (2013) The alpha2delta subunits of voltage-gated calcium channels. *Biochimica et biophysica acta* 1828:1541-1549.
- Dowdall T, Robinson I, Meert TF (2005) Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 80:93-108.
- Drel VR, Mashtalir N, Ilnytska O, Shin J, Li F, Lyzogubov VV, Obrosova IG (2006) The leptin-deficient (ob/ob) mouse: a new animal model of peripheral neuropathy of type 2 diabetes and obesity. *Diabetes* 55:3335-3343.
- Duale C, Ouchchane L, Schoeffler P, Group EI, Dubray C (2014) Neuropathic aspects of persistent postsurgical pain: a French multicenter survey with a 6-month prospective follow-up. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 15:24 e21-24 e20.
- Dubovy P (2011) Wallerian degeneration and peripheral nerve conditions for both axonal regeneration and neuropathic pain induction. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 193:267-275.
- Duman RS (2002) Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity. *European psychiatry : the journal of the Association of European Psychiatrists* 17 Suppl 3:306-310.
- Dworkin RH, O'Connor AB, Backonja M, Farrar JT, Finnerup NB, Jensen TS, Kalso EA, Loeser JD, Miaskowski C, Nurmikko TJ, Portenoy RK, Rice AS, Stacey BR, Treede RD, Turk DC, Wallace MS (2007) Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain* 132:237-251.
- Dworkin RH et al. (2005) Core outcome measures for chronic pain clinical trials: IMMPACT recommendations. *Pain* 113:9-19.
- Eisenach JC (2006) Preventing chronic pain after surgery: who, how, and when? *Regional anesthesia and pain medicine* 31:1-3.
- Ferrini F, Trang T, Mattioli TA, Laffray S, Del'Guidice T, Lorenzo LE, Castonguay A, Doyon N, Zhang W, Godin AG, Mohr D, Beggs S, Vandal K, Beaulieu JM, Cahill CM, Salter MW, De Koninck Y

- (2013) Morphine hyperalgesia gated through microglia-mediated disruption of neuronal Cl(-) homeostasis. *Nature neuroscience* 16:183-192.
- Fertleman CR, Baker MD, Parker KA, Moffatt S, Elmslie FV, Abrahamsen B, Ostman J, Klugbauer N, Wood JN, Gardiner RM, Rees M (2006) SCN9A mutations in paroxysmal extreme pain disorder: allelic variants underlie distinct channel defects and phenotypes. *Neuron* 52:767-774.
- Field MJ, Cox PJ, Stott E, Melrose H, Offord J, Su TZ, Bramwell S, Corradini L, England S, Winks J, Kinloch RA, Hendrich J, Dolphin AC, Webb T, Williams D (2006) Identification of the alpha2-delta-1 subunit of voltage-dependent calcium channels as a molecular target for pain mediating the analgesic actions of pregabalin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:17537-17542.
- Finnerup NB, Sindrup SH, Jensen TS (2007) Chronic neuropathic pain: mechanisms, drug targets and measurement. *Fundamental & clinical pharmacology* 21:129-136.
- Finnerup NB, Sindrup SH, Jensen TS (2010) The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. *Pain* 150:573-581.
- Fischer TZ, Waxman SG (2010) Familial pain syndromes from mutations of the Nav1.7 sodium channel. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1184:196-207.
- Gabay E, Tal M (2004) Pain behavior and nerve electrophysiology in the CCI model of neuropathic pain. *Pain* 110:354-360.
- Gautron M, Jazat F, Ratinahirana H, Hauw JJ, Guilbaud G (1990) Alterations in myelinated fibres in the sciatic nerve of rats after constriction: possible relationships between the presence of abnormal small myelinated fibres and pain-related behaviour. *Neuroscience letters* 111:28-33.
- Gerbershagen HJ, Ozgur E, Dagtekin O, Straub K, Hahn M, Heidenreich A, Sabatowski R, Petzke F (2009) Preoperative pain as a risk factor for chronic post-surgical pain - six month follow-up after radical prostatectomy. *European journal of pain* 13:1054-1061.
- Gibbons CH, Freeman R (2010) Treatment-induced diabetic neuropathy: a reversible painful autonomic neuropathy. *Annals of neurology* 67:534-541.
- Goldstein DJ, Lu Y, Detke MJ, Lee TC, Iyengar S (2005) Duloxetine vs. placebo in patients with painful diabetic neuropathy. *Pain* 116:109-118.
- Gordois A, Scuffham P, Shearer A, Oglesby A, Tobian JA (2003) The health care costs of diabetic peripheral neuropathy in the US. *Diabetes care* 26:1790-1795.
- Gottschalk A, Ochroch EA (2008) Clinical and demographic characteristics of patients with chronic pain after major thoracotomy. *Clin J Pain* 24:708-716.
- Gracely RH, Lynch SA, Bennett GJ (1992) Painful neuropathy: altered central processing maintained dynamically by peripheral input. *Pain* 51:175-194.
- Gregory NS, Harris AL, Robinson CR, Dougherty PM, Fuchs PN, Sluka KA (2013) An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 14:1255-1269.
- Grover VS, Sharma A, Singh M (2000) Role of nitric oxide in diabetes-induced attenuation of antinociceptive effect of morphine in mice. *European journal of pharmacology* 399:161-164.
- Guastella V, Mick G, Soriano C, Vallet L, Escande G, Dubray C, Eschalier A (2011) A prospective study of neuropathic pain induced by thoracotomy: incidence, clinical description, and diagnosis. *Pain* 152:74-81.
- Guillon JM (2010) [Place and role of safety pharmacology in drug development]. *Annales pharmaceutiques francaises* 68:291-300.
- Han C, Rush AM, Dib-Hajj SD, Li S, Xu Z, Wang Y, Tyrrell L, Wang X, Yang Y, Waxman SG (2006) Sporadic onset of erythralgia: a gain-of-function mutation in Nav1.7. *Annals of neurology* 59:553-558.
- Haroutiunian S, Nikolajsen L, Finnerup NB, Jensen TS (2013) The neuropathic component in persistent postsurgical pain: a systematic literature review. *Pain* 154:95-102.

- Hendrich J, Van Minh AT, Hebllich F, Nieto-Rostro M, Watschinger K, Striessnig J, Wratten J, Davies A, Dolphin AC (2008) Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the alpha2delta ligand gabapentin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:3628-3633.
- Hindmarch I, Trick L, Ridout F (2005) A double-blind, placebo- and positive-internal-controlled (alprazolam) investigation of the cognitive and psychomotor profile of pregabalin in healthy volunteers. *Psychopharmacology* 183:133-143.
- Hinrichs-Rocker A, Schulz K, Jarvinen I, Lefering R, Simanski C, Neugebauer EA (2009) Psychosocial predictors and correlates for chronic post-surgical pain (CPSP) - a systematic review. *European journal of pain* 13:719-730.
- Ho KY, Gan TJ, Habib AS (2006) Gabapentin and postoperative pain--a systematic review of randomized controlled trials. *Pain* 126:91-101.
- Hoke A (2012) Animal models of peripheral neuropathies. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 9:262-269.
- Hu P, Bembrick AL, Keay KA, McLachlan EM (2007) Immune cell involvement in dorsal root ganglia and spinal cord after chronic constriction or transection of the rat sciatic nerve. *Brain, behavior, and immunity* 21:599-616.
- Huang J, Zhang X, McNaughton PA (2006) Modulation of temperature-sensitive TRP channels. *Seminars in cell & developmental biology* 17:638-645.
- Huang J, Yang Y, Zhao P, Gerrits MM, Hoeijmakers JG, Bekelaar K, Merkies IS, Faber CG, Dib-Hajj SD, Waxman SG (2013) Small-fiber neuropathy Nav1.8 mutation shifts activation to hyperpolarized potentials and increases excitability of dorsal root ganglion neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:14087-14097.
- Hung SI, Chung WH, Jee SH, Chen WC, Chang YT, Lee WR, Hu SL, Wu MT, Chen GS, Wong TW, Hsiao PF, Chen WH, Shih HY, Fang WH, Wei CY, Lou YH, Huang YL, Lin JJ, Chen YT (2006) Genetic susceptibility to carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions. *Pharmacogenetics and genomics* 16:297-306.
- Ikeda H, Heinke B, Ruscheweyh R, Sandkuhler J (2003) Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia. *Science* 299:1237-1240.
- Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, Sonoda N, Sato N, Sekiguchi N, Kobayashi K, Sumimoto H, Utsumi H, Nawata H (2003) Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 14:S227-232.
- Islam MS (2013) Animal models of diabetic neuropathy: progress since 1960s. *Journal of diabetes research* 2013:149452.
- Jaggi AS, Jain V, Singh N (2011) Animal models of neuropathic pain. *Fundamental & clinical pharmacology* 25:1-28.
- Jakobsen J, Lundbaek K (1976) Neuropathy in experimental diabetes: an animal model. *British medical journal* 2:278-279.
- Janssen SP, Truin M, Van Kleef M, Joosten EA (2011) Differential GABAergic disinhibition during the development of painful peripheral neuropathy. *Neuroscience* 184:183-194.
- Jensen MP, Chodroff MJ, Dworkin RH (2007) The impact of neuropathic pain on health-related quality of life: review and implications. *Neurology* 68:1178-1182.
- Jensen TS, Krebs B, Nielsen J, Rasmussen P (1983) Phantom limb, phantom pain and stump pain in amputees during the first 6 months following limb amputation. *Pain* 17:243-256.
- Ji RR, Berta T, Nedergaard M (2013) Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain* 154 Suppl 1:S10-28.
- Jin F, Chung F (2001) Multimodal analgesia for postoperative pain control. *Journal of clinical anesthesia* 13:524-539.
- Johansen A, Schirmer H, Stubhaug A, Nielsen CS (2014) Persistent post-surgical pain and experimental pain sensitivity in the Tromso study: comorbid pain matters. *Pain* 155:341-348.



- Johansen A, Romundstad L, Nielsen CS, Schirmer H, Stubhaug A (2012) Persistent postsurgical pain in a general population: prevalence and predictors in the Tromso study. *Pain* 153:1390-1396.
- Jolivalt CG, Lee CA, Ramos KM, Calcutt NA (2008) Allodynia and hyperalgesia in diabetic rats are mediated by GABA and depletion of spinal potassium-chloride co-transporters. *Pain* 140:48-57.
- Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413:203-210.
- Kaba A, Laurent SR, Detroz BJ, Sessler DI, Durieux ME, Lamy ML, Joris JL (2007) Intravenous lidocaine infusion facilitates acute rehabilitation after laparoscopic colectomy. *Anesthesiology* 106:11-18; discussion 15-16.
- Kairaluoma PM, Bachmann MS, Rosenberg PH, Pere PJ (2006) Preincisional paravertebral block reduces the prevalence of chronic pain after breast surgery. *Anesthesia and analgesia* 103:703-708.
- Kang YJ, Vincler M, Li X, Conklin D, Eisenach JC (2002) Intrathecal ketorolac reverses hypersensitivity following acute fentanyl exposure. *Anesthesiology* 97:1641-1644.
- Karanikolas M, Aretha D, Tsolakis I, Monantera G, Kiekkas P, Papadoulas S, Swarm RA, Filos KS (2011) Optimized perioperative analgesia reduces chronic phantom limb pain intensity, prevalence, and frequency: a prospective, randomized, clinical trial. *Anesthesiology* 114:1144-1154.
- Katano T, Nakazawa T, Nakatsuka T, Watanabe M, Yamamoto T, Ito S (2011) Involvement of spinal phosphorylation cascade of Tyr1472-NR2B, Thr286-CaMKII, and Ser831-GluR1 in neuropathic pain. *Neuropharmacology* 60:609-616.
- Katz J, Clarke H, Seltzer Z (2011) Review article: Preventive analgesia: quo vadimus? *Anesthesia and analgesia* 113:1242-1253.
- Katz J, Poleshuck EL, Andrus CH, Hogan LA, Jung BF, Kulick DI, Dworkin RH (2005) Risk factors for acute pain and its persistence following breast cancer surgery. *Pain* 119:16-25.
- Kawasaki Y, Zhang L, Cheng JK, Ji RR (2008) Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:5189-5194.
- Kehlet H, Dahl JB (1993) The value of "multimodal" or "balanced analgesia" in postoperative pain treatment. *Anesthesia and analgesia* 77:1048-1056.
- Kehlet H, Rathmell JP (2010) Persistent postsurgical pain: the path forward through better design of clinical studies. *Anesthesiology* 112:514-515.
- Kehlet H, Jensen TS, Woolf CJ (2006) Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention. *Lancet* 367:1618-1625.
- Khasabov SG, Rogers SD, Ghilardi JR, Peters CM, Mantyh PW, Simone DA (2002) Spinal neurons that possess the substance P receptor are required for the development of central sensitization. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:9086-9098.
- Kim CF, Moalem-Taylor G (2011) Detailed characterization of neuro-immune responses following neuropathic injury in mice. *Brain research* 1405:95-108.
- Kim DS, Choi JO, Rim HD, Cho HJ (2002) Downregulation of voltage-gated potassium channel alpha gene expression in dorsal root ganglia following chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. *Brain research Molecular brain research* 105:146-152.
- Kim SH, Chung JM (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50:355-363.
- King T, Vera-Portocarrero L, Gutierrez T, Vanderah TW, Dussor G, Lai J, Fields HL, Porreca F (2009) Unmasking the tonic-aversive state in neuropathic pain. *Nature neuroscience* 12:1364-1366.
- Kissin I (2005) Preemptive analgesia at the crossroad. *Anesthesia and analgesia* 100:754-756.
- Koltzenburg M, Torebjork HE, Wahren LK (1994) Nociceptor modulated central sensitization causes mechanical hyperalgesia in acute chemogenic and chronic neuropathic pain. *Brain : a journal of neurology* 117 ( Pt 3):579-591.

- Kong VK, Irwin MG (2007) Gabapentin: a multimodal perioperative drug? *British journal of anaesthesia* 99:775-786.
- Konopka KH, van Wijhe M (2010) Opioid-induced hyperalgesia: pain hurts? *British journal of anaesthesia* 105:555-557.
- Krause SJ, Backonja MM (2003) Development of a neuropathic pain questionnaire. *The Clinical journal of pain* 19:306-314.
- Kristensen AD, Pedersen TA, Hjortdal VE, Jensen TS, Nikolajsen L (2010) Chronic pain in adults after thoracotomy in childhood or youth. *British journal of anaesthesia* 104:75-79.
- Kuner R (2010) Central mechanisms of pathological pain. *Nature medicine* 16:1258-1266.
- Kusuda R, Ravanelli MI, Cadetti F, Franciosi A, Previdelli K, Zanon S, Lucas G (2013) Long-term antidepressant treatment inhibits neuropathic pain-induced CREB and PLCgamma-1 phosphorylation in the mouse spinal cord dorsal horn. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 14:1162-1172.
- Laboureyras E, Chateauraynaud J, Richebe P, Simonnet G (2009) Long-term pain vulnerability after surgery in rats: prevention by nefopam, an analgesic with antihyperalgesic properties. *Anesthesia and analgesia* 109:623-631.
- Lanneau C, Green A, Hirst WD, Wise A, Brown JT, Donnier E, Charles KJ, Wood M, Davies CH, Pangalos MN (2001) Gabapentin is not a GABAB receptor agonist. *Neuropharmacology* 41:965-975.
- Latremoliere A, Woolf CJ (2009) Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 10:895-926.
- Leung L, Cahill CM (2010) TNF-alpha and neuropathic pain--a review. *Journal of neuroinflammation* 7:27.
- Li CY, Song YH, Higuera ES, Luo ZD (2004) Spinal dorsal horn calcium channel alpha2delta-1 subunit upregulation contributes to peripheral nerve injury-induced tactile allodynia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:8494-8499.
- Li CY, Zhang XL, Matthews EA, Li KW, Kurwa A, Boroujerdi A, Gross J, Gold MS, Dickenson AH, Feng G, Luo ZD (2006a) Calcium channel alpha2delta1 subunit mediates spinal hyperexcitability in pain modulation. *Pain* 125:20-34.
- Li D, Yang H, Meyerson BA, Linderoth B (2006b) Response to spinal cord stimulation in variants of the spared nerve injury pain model. *Neuroscience letters* 400:115-120.
- Li XY, Ko HG, Chen T, Descalzi G, Koga K, Wang H, Kim SS, Shang Y, Kwak C, Park SW, Shim J, Lee K, Collingridge GL, Kaang BK, Zhuo M (2010) Alleviating neuropathic pain hypersensitivity by inhibiting PKMzeta in the anterior cingulate cortex. *Science* 330:1400-1404.
- Light KC, Bragdon EE, Grewen KM, Brownley KA, Girdler SS, Maixner W (2009) Adrenergic dysregulation and pain with and without acute beta-blockade in women with fibromyalgia and temporomandibular disorder. *J Pain* 10:542-552.
- Lingueglia E (2007) Acid-sensing ion channels in sensory perception. *The Journal of biological chemistry* 282:17325-17329.
- Liu FY, Sun YN, Wang FT, Li Q, Su L, Zhao ZF, Meng XL, Zhao H, Wu X, Sun Q, Xing GG, Wan Y (2012) Activation of satellite glial cells in lumbar dorsal root ganglia contributes to neuropathic pain after spinal nerve ligation. *Brain research* 1427:65-77.
- Liu L, Rudin M, Kozlova EN (2000) Glial cell proliferation in the spinal cord after dorsal rhizotomy or sciatic nerve transection in the adult rat. *Experimental brain research* 131:64-73.
- Lombard MC, Nashold BS, Jr., Albe-Fessard D, Salman N, Sakr C (1979) Deafferentation hypersensitivity in the rat after dorsal rhizotomy: a possible animal model of chronic pain. *Pain* 6:163-174.
- Lu Y, Zheng J, Xiong L, Zimmermann M, Yang J (2008) Spinal cord injury-induced attenuation of GABAergic inhibition in spinal dorsal horn circuits is associated with down-regulation of the chloride transporter KCC2 in rat. *The Journal of physiology* 586:5701-5715.
- Macrae WA (2008) Chronic post-surgical pain: 10 years on. *British journal of anaesthesia* 101:77-86.

- Maguire MF, Ravenscroft A, Beggs D, Duffy JP (2006) A questionnaire study investigating the prevalence of the neuropathic component of chronic pain after thoracic surgery. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 29:800-805.
- Malmberg AB, Basbaum AI (1998) Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain* 76:215-222.
- Mamie C, Bernstein M, Morabia A, Klopfenstein CE, Sloutskis D, Forster A (2004) Are there reliable predictors of postoperative pain? *Acta anaesthesiologica Scandinavica* 48:234-242.
- Marais E, Klugbauer N, Hofmann F (2001) Calcium channel alpha(2)delta subunits-structure and Gabapentin binding. *Molecular pharmacology* 59:1243-1248.
- Marchand F, Tsantoulas C, Singh D, Grist J, Clark AK, Bradbury EJ, McMahon SB (2009) Effects of Etanercept and Minocycline in a rat model of spinal cord injury. *European journal of pain* 13:673-681.
- Marchettini P, Teloni L, Formaglio F, Lacerenza M (2004) Pain in diabetic neuropathy case study: whole patient management. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 11 Suppl 1:12-21.
- Martinez JA, Kasamatsu M, Rosales-Hernandez A, Hanson LR, Frey WH, Toth CC (2012a) Comparison of central versus peripheral delivery of pregabalin in neuropathic pain states. *Molecular pain* 8:3.
- Martinez V, Baudic S, Fletcher D (2013) [Chronic postsurgical pain]. *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation* 32:422-435.
- Martinez V, Ben Ammar S, Judet T, Bouhassira D, Chauvin M, Fletcher D (2012b) Risk factors predictive of chronic postsurgical neuropathic pain: the value of the iliac crest bone harvest model. *Pain* 153:1478-1483.
- Matsumura S, Kunori S, Mabuchi T, Katano T, Nakazawa T, Abe T, Watanabe M, Yamamoto T, Okuda-Ashitaka E, Ito S (2010) Impairment of CaMKII activation and attenuation of neuropathic pain in mice lacking NR2B phosphorylated at Tyr1472. *The European journal of neuroscience* 32:798-810.
- Maves TJ, Pechman PS, Gebhart GF, Meller ST (1993) Possible chemical contribution from chronic gut sutures produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 54:57-69.
- Max MB, Culnane M, Schafer SC, Gracely RH, Walther DJ, Smoller B, Dubner R (1987) Amitriptyline relieves diabetic neuropathy pain in patients with normal or depressed mood. *Neurology* 37:589-596.
- McQuay H, Carroll D, Jadad AR, Wiffen P, Moore A (1995) Anticonvulsant drugs for management of pain: a systematic review. *Bmj* 311:1047-1052.
- McQuay HJ, Tramer M, Nye BA, Carroll D, Wiffen PJ, Moore RA (1996) A systematic review of antidepressants in neuropathic pain. *Pain* 68:217-227.
- Meyer-Rosberg K, Kvarnstrom A, Kinnman E, Gordh T, Nordfors LO, Kristofferson A (2001) Peripheral neuropathic pain--a multidimensional burden for patients. *European journal of pain* 5:379-389.
- Mika J, Zychowska M, Popiolek-Barczyk K, Rojewska E, Przewlocka B (2013) Importance of glial activation in neuropathic pain. *European journal of pharmacology* 716:106-119.
- Mika J, Osikowicz M, Rojewska E, Korostynski M, Wawrzczak-Bargiela A, Przewlocki R, Przewlocka B (2009) Differential activation of spinal microglial and astroglial cells in a mouse model of peripheral neuropathic pain. *European journal of pharmacology* 623:65-72.
- Mikkelsen T, Werner MU, Lassen B, Kehlet H (2004) Pain and sensory dysfunction 6 to 12 months after inguinal herniotomy. *Anesthesia and analgesia* 99:146-151.
- Miletic G, Sullivan KM, Dodson AM, Lippitt JA, Schneider JA, Miletic V (2011) Changes in calcineurin message, enzyme activity and protein content in the spinal dorsal horn are associated with chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. *Neuroscience* 188:142-147.
- Moalem G, Tracey DJ (2006) Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain research reviews* 51:240-264.

- Mogil JS (2009) Animal models of pain: progress and challenges. *Nature reviews Neuroscience* 10:283-294.
- Mogil JS, Crager SE (2004) What should we be measuring in behavioral studies of chronic pain in animals? *Pain* 112:12-15.
- Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H, Woolf CJ (2002) Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:6724-6731.
- Moore SA, Peterson RG, Felten DL, O'Connor BL (1980) A quantitative comparison of motor and sensory conduction velocities in short- and long-term streptozotocin- and alloxan-diabetic rats. *Journal of the neurological sciences* 48:133-152.
- Morimoto S, Ito M, Oda S, Sugiyama A, Kuroda M, Adachi-Akahane S (2012) Spinal mechanism underlying the antiallodynic effect of gabapentin studied in the mouse spinal nerve ligation model. *Journal of pharmacological sciences* 118:455-466.
- Mosconi T, Kruger L (1996) Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy: ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations. *Pain* 64:37-57.
- Nara T, Saito S, Obata H, Goto F (2001) A rat model of postthoracotomy pain: behavioural and spinal cord NK-1 receptor assessment. *Canadian journal of anaesthesia = Journal canadien d'anesthesie* 48:665-676.
- Navarro X, Vivo M, Valero-Cabre A (2007) Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Progress in neurobiology* 82:163-201.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002) Neurobiology of depression. *Neuron* 34:13-25.
- Nitzan-Luques A, Devor M, Tal M (2011) Genotype-selective phenotypic switch in primary afferent neurons contributes to neuropathic pain. *Pain* 152:2413-2426.
- Norbury TA, MacGregor AJ, Urwin J, Spector TD, McMahon SB (2007) Heritability of responses to painful stimuli in women: a classical twin study. *Brain : a journal of neurology* 130:3041-3049.
- O'Connor AB (2009) Neuropathic pain: quality-of-life impact, costs and cost effectiveness of therapy. *Pharmacoeconomics* 27:95-112.
- Oates PJ (2002) Polyol pathway and diabetic peripheral neuropathy. *International review of neurobiology* 50:325-392.
- Obrosova IG, Ilnytska O, Lyzogubov VV, Pavlov IA, Mashtalir N, Nadler JL, Drel VR (2007) High-fat diet induced neuropathy of pre-diabetes and obesity: effects of "healthy" diet and aldose reductase inhibition. *Diabetes* 56:2598-2608.
- Ochoa JL, Campero M, Serra J, Bostock H (2005) Hyperexcitable polymodal and insensitive nociceptors in painful human neuropathy. *Muscle & nerve* 32:459-472.
- Ong CK, Lirk P, Seymour RA, Jenkins BJ (2005) The efficacy of preemptive analgesia for acute postoperative pain management: a meta-analysis. *Anesthesia and analgesia* 100:757-773, table of contents.
- Orhan CE, Onal A, Ulker S (2010) Antihyperalgesic and antiallodynic effect of sirolimus in neuropathic pain and the role of cytokines in this effect. *Neuroscience letters* 481:17-20.
- Orstavik K, Jorum E (2010) Microneurographic findings of relevance to pain in patients with erythromelalgia and patients with diabetic neuropathy. *Neuroscience letters* 470:180-184.
- Orstavik K, Namer B, Schmidt R, Schmelz M, Hilliges M, Weidner C, Carr RW, Handwerker H, Jorum E, Torebjork HE (2006) Abnormal function of C-fibers in patients with diabetic neuropathy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:11287-11294.
- Pabreja K, Dua K, Sharma S, Padi SS, Kulkarni SK (2011) Minocycline attenuates the development of diabetic neuropathic pain: possible anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms. *European journal of pharmacology* 661:15-21.

- Padi SS, Kulkarni SK (2008) Minocycline prevents the development of neuropathic pain, but not acute pain: possible anti-inflammatory and antioxidant mechanisms. *European journal of pharmacology* 601:79-87.
- Pan HL, Wu ZZ, Zhou HY, Chen SR, Zhang HM, Li DP (2008) Modulation of pain transmission by G-protein-coupled receptors. *Pharmacology & therapeutics* 117:141-161.
- Pandey CK, Singhal V, Kumar M, Lakra A, Ranjan R, Pal R, Raza M, Singh U, Singh PK (2005) Gabapentin provides effective postoperative analgesia whether administered pre-emptively or post-incision. *Canadian journal of anaesthesia = Journal canadien d'anesthesie* 52:827-831.
- Pendlebury SC, Moses DK, Eadie MJ (1989) Hyponatraemia during oxcarbazepine therapy. *Human toxicology* 8:337-344.
- Percie du Sert N, Rice AS (2014) Improving the translation of analgesic drugs to the clinic: animal models of neuropathic pain. *British journal of pharmacology*.
- Perttunen K, Tasmuth T, Kalso E (1999) Chronic pain after thoracic surgery: a follow-up study. *Acta Anaesthesiol Scand* 43:563-567.
- Pluijms WA, Steegers MA, Verhagen AF, Scheffer GJ, Wilder-Smith OH (2006) Chronic post-thoracotomy pain: a retrospective study. *Acta Anaesthesiol Scand* 50:804-808.
- Pogatzki-Zahn EM, Zahn PK (2006) From preemptive to preventive analgesia. *Current opinion in anaesthesiology* 19:551-555.
- Polgar E, Hughes DI, Riddell JS, Maxwell DJ, Puskar Z, Todd AJ (2003) Selective loss of spinal GABAergic or glycinergic neurons is not necessary for development of thermal hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Pain* 104:229-239.
- Preston GM (1967) Peripheral neuropathy in the alloxan-diabetic rat. *The Journal of physiology* 189:49P-50P.
- Qu X, Seale JP, Donnelly R (1999) Tissue and isoform-selective activation of protein kinase C in insulin-resistant obese Zucker rats - effects of feeding. *The Journal of endocrinology* 162:207-214.
- Quintao NL, Balz D, Santos AR, Campos MM, Calixto JB (2006) Long-lasting neuropathic pain induced by brachial plexus injury in mice: Role triggered by the pro-inflammatory cytokine, tumour necrosis factor alpha. *Neuropharmacology* 50:614-620.
- Randinitis EJ, Posvar EL, Alvey CW, Sedman AJ, Cook JA, Bockbrader HN (2003) Pharmacokinetics of pregabalin in subjects with various degrees of renal function. *Journal of clinical pharmacology* 43:277-283.
- Rantamaki T, Hendolin P, Kankaanpaa A, Mijatovic J, Piepponen P, Domenici E, Chao MV, Mannisto PT, Castren E (2007) Pharmacologically diverse antidepressants rapidly activate brain-derived neurotrophic factor receptor TrkB and induce phospholipase-Cgamma signaling pathways in mouse brain. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 32:2152-2162.
- Rice AS, Cimino-Brown D, Eisenach JC, Kontinen VK, Lacroix-Fralish ML, Machin I, Preclinical Pain C, Mogil JS, Stohr T (2008) Animal models and the prediction of efficacy in clinical trials of analgesic drugs: a critical appraisal and call for uniform reporting standards. *Pain* 139:243-247.
- Riopelle JM (1992) The ethics of using animal models to study treatment of phantom pain. *Anesthesiology* 76:1069-1071.
- Rodrigues-Filho R, Santos AR, Bertelli JA, Calixto JB (2003) Avulsion injury of the rat brachial plexus triggers hyperalgesia and allodynia in the hindpaws: a new model for the study of neuropathic pain. *Brain research* 982:186-194.
- Roose SP (2000) Considerations for the use of antidepressants in patients with cardiovascular disease. *American heart journal* 140:84-88.
- Rose K, Ooi L, Dalle C, Robertson B, Wood IC, Gamper N (2011) Transcriptional repression of the M channel subunit Kv7.2 in chronic nerve injury. *Pain* 152:742-754.

- Saarto T, Wiffen PJ (2010) Antidepressants for neuropathic pain: a Cochrane review. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 81:1372-1373.
- Salengros JC, Huybrechts I, Ducart A, Faraoni D, Marsala C, Barvais L, Cappello M, Engelman E (2010) Different anesthetic techniques associated with different incidences of chronic post-thoracotomy pain: low-dose remifentanyl plus presurgical epidural analgesia is preferable to high-dose remifentanyl with postsurgical epidural analgesia. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia* 24:608-616.
- Schmidt PC, Ruchelli G, Mackey SC, Carroll IR (2013) Perioperative gabapentinoids: choice of agent, dose, timing, and effects on chronic postsurgical pain. *Anesthesiology* 119:1215-1221.
- Schoffnegger D, Ruscheweyh R, Sandkuhler J (2008) Spread of excitation across modality borders in spinal dorsal horn of neuropathic rats. *Pain* 135:300-310.
- Scholz J, Woolf CJ (2007) The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nature neuroscience* 10:1361-1368.
- Scholz J, Broom DC, Youn DH, Mills CD, Kohno T, Suter MR, Moore KA, Decosterd I, Coggeshall RE, Woolf CJ (2005) Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:7317-7323.
- Schulte H, Sollevi A, Segerdahl M (2004) The synergistic effect of combined treatment with systemic ketamine and morphine on experimentally induced windup-like pain in humans. *Anesthesia and analgesia* 98:1574-1580, table of contents.
- Seltzer Z, Dubner R, Shir Y (1990) A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43:205-218.
- Serra J, Bostock H, Sola R, Aleu J, Garcia E, Cokic B, Navarro X, Quiles C (2012) Microneurographic identification of spontaneous activity in C-nociceptors in neuropathic pain states in humans and rats. *Pain* 153:42-55.
- Siau C, Xiao W, Bennett GJ (2006) Paclitaxel- and vincristine-evoked painful peripheral neuropathies: loss of epidermal innervation and activation of Langerhans cells. *Experimental neurology* 201:507-514.
- Sindrup SH, Jensen TS (2002) Pharmacotherapy of trigeminal neuralgia. *The Clinical journal of pain* 18:22-27.
- Sindrup SH, Otto M, Finnerup NB, Jensen TS (2005) Antidepressants in the treatment of neuropathic pain. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 96:399-409.
- Singh K, Phillips FM, Kuo E, Campbell M (2007) A prospective, randomized, double-blind study of the efficacy of postoperative continuous local anesthetic infusion at the iliac crest bone graft site after posterior spinal arthrodesis: a minimum of 4-year follow-up. *Spine* 32:2790-2796.
- Sommer C, Kress M (2004) Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neuroscience letters* 361:184-187.
- Sommer C, Lindenlaub T, Teuteberg P, Schafers M, Hartung T, Toyka KV (2001) Anti-TNF-neutralizing antibodies reduce pain-related behavior in two different mouse models of painful mononeuropathy. *Brain research* 913:86-89.
- Sotgiu ML, Castagna A, Lacerenza M, Marchettini P (1995) Pre-injury lidocaine treatment prevents thermal hyperalgesia and cutaneous thermal abnormalities in a rat model of peripheral neuropathy. *Pain* 61:3-10.
- Subramaniam K, Subramaniam B, Steinbrook RA (2004) Ketamine as adjuvant analgesic to opioids: a quantitative and qualitative systematic review. *Anesthesia and analgesia* 99:482-495, table of contents.
- Sullivan KA, Hayes JM, Wiggin TD, Backus C, Su Oh S, Lentz SI, Brosius F, 3rd, Feldman EL (2007) Mouse models of diabetic neuropathy. *Neurobiology of disease* 28:276-285.
- Takasusuki T, Yaksh TL (2011) The effects of intrathecal and systemic gabapentin on spinal substance P release. *Anesthesia and analgesia* 112:971-976.

- Tal M, Wall PD, Devor M (1999) Myelinated afferent fiber types that become spontaneously active and mechanosensitive following nerve transection in the rat. *Brain research* 824:218-223.
- Tan AM, Chang YW, Zhao P, Hains BC, Waxman SG (2011) Rac1-regulated dendritic spine remodeling contributes to neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Experimental neurology* 232:222-233.
- Tanga FY, Raghavendra V, DeLeo JA (2004) Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain. *Neurochemistry international* 45:397-407.
- Thacker MA, Clark AK, Marchand F, McMahon SB (2007) Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules. *Anesthesia and analgesia* 105:838-847.
- Theile JW, Cummins TR (2011) Recent developments regarding voltage-gated sodium channel blockers for the treatment of inherited and acquired neuropathic pain syndromes. *Frontiers in pharmacology* 2:54.
- Tiippana EM, Hamunen K, Kontinen VK, Kalso E (2007) Do surgical patients benefit from perioperative gabapentin/pregabalin? A systematic review of efficacy and safety. *Anesthesia and analgesia* 104:1545-1556, table of contents.
- Todorovic SM, Lingle CJ (1998) Pharmacological properties of T-type Ca<sup>2+</sup> current in adult rat sensory neurons: effects of anticonvulsant and anesthetic agents. *Journal of neurophysiology* 79:240-252.
- Torrance N, Smith BH, Bennett MI, Lee AJ (2006) The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 7:281-289.
- Toth C, Rong LL, Yang C, Martinez J, Song F, Ramji N, Brussee V, Liu W, Durand J, Nguyen MD, Schmidt AM, Zochodne DW (2008) Receptor for advanced glycation end products (RAGEs) and experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 57:1002-1017.
- Toyoda H, Zhao MG, Ulzhofer B, Wu LJ, Xu H, Seeburg PH, Sprengel R, Kuner R, Zhuo M (2009) Roles of the AMPA receptor subunit GluA1 but not GluA2 in synaptic potentiation and activation of ERK in the anterior cingulate cortex. *Molecular pain* 5:46.
- Tracey I (2011) Can neuroimaging studies identify pain endophenotypes in humans? *Nature reviews Neurology* 7:173-181.
- Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, Hansson P, Hughes R, Nurmikko T, Serra J (2008) Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology* 70:1630-1635.
- Tsuda M, Inoue K, Salter MW (2005) Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia. *Trends in neurosciences* 28:101-107.
- Tsuda M, Kohro Y, Yano T, Tsujikawa T, Kitano J, Tozaki-Saitoh H, Koyanagi S, Ohdo S, Ji RR, Salter MW, Inoue K (2011) JAK-STAT3 pathway regulates spinal astrocyte proliferation and neuropathic pain maintenance in rats. *Brain : a journal of neurology* 134:1127-1139.
- Tulleuda A, Cokic B, Callejo G, Saiani B, Serra J, Gasull X (2011) TRESK channel contribution to nociceptive sensory neurons excitability: modulation by nerve injury. *Molecular pain* 7:30.
- Vallejo R, Tilley DM, Vogel L, Benyamin R (2010) The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. *Pain practice : the official journal of World Institute of Pain* 10:167-184.
- Van Acker K, Bouhassira D, De Bacquer D, Weiss S, Matthys K, Raemen H, Mathieu C, Colin IM (2009) Prevalence and impact on quality of life of peripheral neuropathy with or without neuropathic pain in type 1 and type 2 diabetic patients attending hospital outpatients clinics. *Diabetes & metabolism* 35:206-213.
- van Gulik L, Ahlers SJ, van de Garde EM, Bruins P, van Boven WJ, Tibboel D, van Dongen EP, Knibbe CA (2012) Remifentanyl during cardiac surgery is associated with chronic thoracic pain 1 yr after sternotomy. *British journal of anaesthesia* 109:616-622.
- van Hecke O, Austin SK, Khan RA, Smith BH, Torrance N (2014) Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies. *Pain* 155:654-662.

- von Hehn CA, Baron R, Woolf CJ (2012) Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. *Neuron* 73:638-652.
- Wagner R, Myers RR (1996) Endoneurial injection of TNF- $\alpha$  produces neuropathic pain behaviors. *Neuroreport* 7:2897-2901.
- Wall PD (1988) The prevention of postoperative pain. *Pain* 33:289-290.
- Wall PD, Devor M, Inbal R, Scadding JW, Schonfeld D, Seltzer Z, Tomkiewicz MM (1979) Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain* 7:103-111.
- Wang H, Sun H, Della Penna K, Benz RJ, Xu J, Gerhold DL, Holder DJ, Koblan KS (2002) Chronic neuropathic pain is accompanied by global changes in gene expression and shares pathobiology with neurodegenerative diseases. *Neuroscience* 114:529-546.
- Watson CP, Evans RJ, Reed K, Merskey H, Goldsmith L, Warsh J (1982) Amitriptyline versus placebo in postherpetic neuralgia. *Neurology* 32:671-673.
- Weinbroum AA (2012) Non-opioid IV adjuvants in the perioperative period: pharmacological and clinical aspects of ketamine and gabapentinoids. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 65:411-429.
- Wiffen P, Collins S, McQuay H, Carroll D, Jadad A, Moore A (2005) Anticonvulsant drugs for acute and chronic pain. *The Cochrane database of systematic reviews*:CD001133.
- Wiffen PJ, Derry S, Moore RA, McQuay HJ (2011) Carbamazepine for acute and chronic pain in adults. *The Cochrane database of systematic reviews*:CD005451.
- Wildgaard K, Ringsted TK, Aasvang EK, Ravn J, Werner MU, Kehlet H (2012) Neurophysiological characterization of persistent postthoracotomy pain. *Clin J Pain* 28:136-142.
- Wodarski R, Clark AK, Grist J, Marchand F, Malfangio M (2009) Gabapentin reverses microglial activation in the spinal cord of streptozotocin-induced diabetic rats. *European journal of pain* 13:807-811.
- Wolfe GI, Hotz SE, Barohn RJ (2002) Treatment of painful peripheral neuropathy. *Journal of clinical neuromuscular disease* 4:50-59.
- Woolf CJ (2011) Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain* 152:S2-15.
- Woolf CJ, Mannion RJ (1999) Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 353:1959-1964.
- Woolf CJ, Salter MW (2000) Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288:1765-1769.
- Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE (1992) Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 355:75-78.
- Wu G, Ringkamp M, Hartke TV, Murinson BB, Campbell JN, Griffin JW, Meyer RA (2001) Early onset of spontaneous activity in uninjured C-fiber nociceptors after injury to neighboring nerve fibers. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:RC140.
- Xu J, Brennan TJ (2009) Comparison of skin incision vs. skin plus deep tissue incision on ongoing pain and spontaneous activity in dorsal horn neurons. *Pain* 144:329-339.
- Yalcin I, Tessier LH, Petit-Demouliere N, Doridot S, Hein L, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2009a) Beta2-adrenoceptors are essential for desipramine, venlafaxine or reboxetine action in neuropathic pain. *Neurobiology of disease* 33:386-394.
- Yalcin I, Tessier LH, Petit-Demouliere N, Waltisperger E, Hein L, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2010) Chronic treatment with agonists of beta(2)-adrenergic receptors in neuropathic pain. *Experimental neurology* 221:115-121.
- Yalcin I, Bohren Y, Waltisperger E, Sage-Ciocca D, Yin JC, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2011) A time-dependent history of mood disorders in a murine model of neuropathic pain. *Biological psychiatry* 70:946-953.
- Yalcin I, Choucair-Jaafar N, Benbouzid M, Tessier LH, Muller A, Hein L, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2009b) beta(2)-adrenoceptors are critical for antidepressant treatment of neuropathic pain. *Annals of neurology* 65:218-225.



- Yanagidate F, Strichartz GR (2006) Bupivacaine inhibits activation of neuronal spinal extracellular receptor-activated kinase through selective effects on ionotropic receptors. *Anesthesiology* 104:805-814.
- Yang F, Whang J, Derry WT, Vardeh D, Scholz J (2014) Analgesic treatment with pregabalin does not prevent persistent pain after peripheral nerve injury in the rat. *Pain* 155:356-366.
- Yawn BP, Wollan PC, Weingarten TN, Watson JC, Hooten WM, Melton LJ, 3rd (2009) The prevalence of neuropathic pain: clinical evaluation compared with screening tools in a community population. *Pain medicine* 10:586-593.
- Young MJ, Boulton AJ, MacLeod AF, Williams DR, Sonksen PH (1993) A multicentre study of the prevalence of diabetic peripheral neuropathy in the United Kingdom hospital clinic population. *Diabetologia* 36:150-154.
- Zhang H, Nei H, Dougherty PM (2010) A p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism of disinhibition in spinal synaptic transmission induced by tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:12844-12855.
- Zhang J, Ho KY, Wang Y (2011) Efficacy of pregabalin in acute postoperative pain: a meta-analysis. *British journal of anaesthesia* 106:454-462.
- Zhang W, Gardell S, Zhang D, Xie JY, Agnes RS, Badghisi H, Hruby VJ, Rance N, Ossipov MH, Vanderah TW, Porreca F, Lai J (2009) Neuropathic pain is maintained by brainstem neurons co-expressing opioid and cholecystokinin receptors. *Brain : a journal of neurology* 132:778-787.
- Zimmermann K, Leffler A, Babes A, Cendan CM, Carr RW, Kobayashi J, Nau C, Wood JN, Reeh PW (2007) Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. *Nature* 447:855-858.
- Zubieta JK, Heitzeg MM, Smith YR, Bueller JA, Xu K, Xu Y, Koeppe RA, Stohler CS, Goldman D (2003) COMT val158met genotype affects mu-opioid neurotransmitter responses to a pain stressor. *Science* 299:1240-1243.

## Traitements précoces et tardifs des douleurs neuropathiques et $\beta_2$ -agonistes : études thérapeutiques précliniques et cliniques

### Résumé

Les douleurs neuropathiques sont secondaires à une maladie ou à une lésion affectant le système nerveux somatosensoriel et sont mal soulagées par les antalgiques usuels. Dans notre travail préclinique, nous avons étudié l'effet de différentes molécules, dont des antidépresseurs et antiépileptiques recommandés dans le traitement des douleurs neuropathiques. Dans un modèle murin de neuropathie traumatique, nous avons étudié l'influence de la période de traitement, précoce ou tardif, sur l'allodynie mécanique. Un traitement précoce par gabapentine ou par carbamazépine permet d'observer un effet préventif sur la chronicisation de l'allodynie. Dans un modèle murin de neuropathie diabétique, nous avons caractérisé l'action anti-allodynique d'un traitement par nortriptyline et par terbutaline. En clinique, nous avons réalisé un travail d'enquête rétrospective sur des patients opérés par thoracotomie. L'analyse des résultats montre une diminution significative du risque de présenter des douleurs chroniques avec des caractéristiques neuropathiques chez les patients traités par  $\beta_2$ -agonistes au long cours.

Mots-clés : douleurs neuropathiques, antiépileptiques,  $\beta_2$ -agonistes, modèle animal.

### Abstract

Neuropathic pain is caused by a lesion or disease of the somatosensory nervous system and is badly relieved by usual analgics. In our preclinical work, we studied the effect of various molecules, in particular antidepressant and anticonvulsant drugs which are recommended in the treatment of neuropathic pain. In a murine model of traumatic neuropathy, we studied the influence of the period of treatment, early or late, on the mechanical allodynia. An early treatment with gabapentin or carbamazepine leads to a preventive effect on sustained allodynia. In a murine model of diabetic neuropathy, we characterized the antiallodynic action of nortriptyline and terbutaline. In our clinical work, we realized a retrospective survey on patients operated by thoracotomy. The analysis of the results show a significant decrease of the risk to suffer from chronic pain with neuropathic characteristics in patients treated with long-term  $\beta_2$ -agonists.

Keys words: neuropathic pain, anticonvulsants,  $\beta_2$ -agonists, animal model.