



HAL
open science

Etude du mécanisme antalgique du Paracétamol; région cérébrale et mécanisme mis en jeu.

Romain Dalmann

► To cite this version:

Romain Dalmann. Etude du mécanisme antalgique du Paracétamol; région cérébrale et mécanisme mis en jeu.. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2015. Français. NNT: 2015CLF1MM08 . tel-01874965

HAL Id: tel-01874965

<https://theses.hal.science/tel-01874965>

Submitted on 15 Sep 2018

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 Blaise Pascal

Université d'Auvergne

Année : 2015

N° d'ordre

ÉCOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
THÈSE

Présentée à l'Université d'Auvergne
Pour l'obtention du grade de DOCTEUR
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : **Neurosciences**

Soutenue le **8 juillet 2015**

Romain DALMANN

ÉTUDE DU MÉCANISME ANTALGIQUE DU PARACÉTAMOL :
RÉGION CÉRÉBRALE ET MÉCANISME MIS EN JEU

Président :

Pr Alain Eschalièr

Rapporteurs :

Pr Dominique Deplanque

Dr Éric Boccard

Examineurs :

Dr François Caussade

Dr Christophe Mallet

Université Blaise Pascal

Université d'Auvergne

Année : 2015

N° d'ordre

ÉCOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
THÈSE

Présentée à l'Université d'Auvergne
Pour l'obtention du grade de DOCTEUR
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : **Neurosciences**

Soutenue le **8 juillet 2015**

Romain DALMANN

ÉTUDE DU MÉCANISME ANTALGIQUE DU PARACÉTAMOL :
RÉGION CÉRÉBRALE ET MÉCANISME MIS EN JEU

Président :

Pr Alain Eschalièr

Rapporteurs :

Pr Dominique Deplanque

Dr Éric Boccard

Examineurs :

Dr François Caussade

Dr Christophe Mallet

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe L'UMR1107 NEURO-DOL à l'Université d'Auvergne, sous la co-direction du Dr Christophe Mallet et du Professeure Laurence Daulhac. Ce projet a été soutenu et financé par Bristol-Myers Squibb.

Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements :

- À Monsieur le Professeur Alain Eschalière de m'avoir fait confiance et de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Votre enthousiasme concernant les travaux sur le paracétamol a été un réel moteur pour élucider ce grand mystère qui parfois en fait rire plus d'un... Je vous remercie également pour votre aide et votre soutien qui m'a permis d'arriver où je suis. Merci également de présider cette thèse.

- À mes directeurs de Thèse : Laurence Daulhac et Christophe Mallet. Grâce à vous, j'ai mené à bout ce projet malgré toutes les difficultés et mes lacunes, vous avez su me faire confiance et me guider. Christophe, merci sincèrement pour ta disponibilité, tes conseils, et bien d'autres choses. Merci Laurence pour tes précieux conseils et suggestions.

- Au Membre du Jury, et en premier lieu à mes rapporteurs : Monsieur le Professeur Dominique Deplanque et Dr. Eric Boccard. Je vous remercie d'avoir accepté de siéger à mon jury de thèse et d'assumer le rôle de rapporteur. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance. Je voudrai remercier Eric Boccard qui a soutenu, toutes ces années grâce à BMS, ce projet complexe autour du mécanisme d'action antalgique du paracétamol. Monsieur François Caussade, je vous suis reconnaissant d'avoir accepté d'examiner ce travail de thèse et surtout de votre intérêt pour la thématique du paracétamol.

Mais également un grand merci à l'ensemble de l'équipe NEURO-DOL :

- Maryse, Monique et Éric, vous m'avez apporté une aide précieuse et je vous en suis sincèrement reconnaissant, sans oublier Mireille, Anne-Marie, Sylvie, Laetitia, Julie, Alexandra, Karim, et Jean-Paul.

- Une grosse pensée pour les anciens et nouveaux thésards. Mon Jérémy qui m'a toujours aidé, soutenu, écouté, même logé. Je te souhaite tout le bonheur et la réussite que tu mérites. À Didine et Véro compagnons de galère du Master SM et de thèse j'ai été content de partager ces quelques années avec vous. À Poupou et Alisson qui m'ont supporté et soutenue mais aussi qui ont su tirer parti malgré moi de mes bêtises. À David, je te suis reconnaissant pour le travail que nous avons fait sur le papier et pour nos discussions autour du paracétamol qui au final n'intéresse que nous. Une pensée aux anciens Vanessa, Stéphane, Maïly, Nico (pas si ancien d'ailleurs), Matthieu, Anne Sophie, Ludivine. Mais aussi aux nouveaux courageux qui se lancent dans l'aventure. Je remercie mes stagiaires Lucie, Élisabeth et Véronique pour leur aide et leur enthousiasme.

- Je suis aussi reconnaissant auprès des séniors Fabien, Jérôme, Christine, Benoît, Mélina, Fred, Alice pour leurs conseils et discussions toujours enrichissantes. Merci À l'équipe de pharmacologie de l'hôpital : Damien Richard, Frédéric Libert, Jérémie, Lucie et Chouki pour votre aide et soutien. Surtout concernant la microdialyse, Damien et Jérémy grâce à vous j'ai remis au goût du jour pendant un bref moment cette technologie complexe qui peut parfois décourager. Merci de m'avoir suivi et vous être investis dans les mises au point des dosages. Ceci m'a permis de montrer que la microdialyse, ça marche... Je remercie également Christophe Melon et Carine Chassain pour m'avoir amené et accueilli à Marseille pour me former sur la méthode de microdialyse.

- Je remercie également le personnel de l'animalerie.

- Également, le laboratoire ANS Biotech avec qui j'ai régulièrement eu des échanges concernant leurs expertises très utiles dans le domaine de l'expérimentation animale, mais aussi je les remercie pour leur disponibilité et aide lorsque je les ai sollicités.

Une pensée particulièrement émue à ma famille et à mes amis :

- Tout d'abord à ma femme que je remercie du fond du cœur pour son soutien qui a été sans faille. Merci pour tout ce que tu fais pour moi, tu n'imagines pas à quel point tu m'as aidé...

- À mes deux petits garçons qui me donnent chaque jour du bonheur

- À mes parents ma sœur mon beau-frère et mes neveux qui ont toujours cru en moi et m'ont soutenu.

- À ma belle-famille qui a su bien prendre soin de moi, merci pour tout.

- À mes amis d'enfance de Villefontaine et mes amis d'Auvergne que j'espère maintenant voir plus régulièrement.

Résumé

Le paracétamol est depuis sa découverte sujet à controverse. Que ce soit son mécanisme d'action, ses effets indésirables ou son efficacité, de nombreuses études ont été réalisées et parfois se contredisent. Parfois critiqué pour son efficacité limitée, il n'a pourtant rien à envier aux autres antalgiques dont l'efficacité est souvent associée à des effets indésirables. Le paracétamol peut se vanter de soulager les douleurs faibles à modérer sans effets indésirables aux doses thérapeutiques. Cela en fait un médicament de premier recours chez la femme enceinte, le nourrisson et l'enfant. D'après un rapport de l'ANSM, sur les 30 substances actives les plus vendues en France en 2013 avec un montant total de 1,15 milliard de boîtes, le paracétamol domine très largement ce classement, puisque ses ventes représentent plus de 500 millions de boîtes. Ainsi, il est aujourd'hui devenu l'antalgique et l'antipyrétique le plus consommé au monde.

De nos jours, la pharmacopée des antalgiques est vieillissante, l'évolution de l'arsenal thérapeutique depuis 50 ans est limitée avec peu de découverte majeure rapportée. Ce constat amène à réévaluer les stratégies de recherche pour innover de nouvelles molécules toujours plus efficaces. Jusqu'à présent l'objectif était de se focaliser sur les quelques molécules ayant un fort potentiel thérapeutique afin d'optimiser leurs efficacités sans comprendre leurs mécanismes. Maintenant, notre intérêt serait de comprendre les mécanismes et les cibles de ces antalgiques afin de développer des analogues plus affins tout en limitant leurs effets indésirables. Basée cette stratégie, le paracétamol est un parfait candidat. En effet, son mécanisme d'action n'est pas parfaitement connu mais son efficacité n'est plus à prouver. L'objectif de ces travaux est d'élucider le mystère qui entoure son mécanisme d'action et de découvrir ses cibles.

Les dernières études redéfinissent le paracétamol comme un précurseur métabolique à l'origine d'un dérivé lipidique actif, nommé AM404. Ce dernier serait synthétisé dans certaines régions cérébrales exprimant l'enzyme FAAH capable de catalyser cette réaction. Le mécanisme alors mis en jeu montre que le paracétamol, *via* l'AM404, activerait les récepteurs TRPV1 centraux et indirectement les récepteurs CB1 pour renforcer un mécanisme central d'atténuation de la douleur *via* les voies descendantes sérotoninergiques. Cependant, le noyau cérébral concerné et le mécanisme cellulaire mis en jeu demeurent inconnus. Des données comportementales associées à une étude d'imagerie fonctionnelle ont levé le voile sur plusieurs régions cérébrales potentiellement impliquées dans l'action du paracétamol, notamment la substance grise périaqueducale. Cette dernière a suscité notre intérêt, car ce noyau exprime à la fois la triade FAAH/TRPV1/CB1, mais aussi est un carrefour des voies descendantes sérotoninergiques. Une activation dans la substance grise périaqueducale des récepteurs TRPV1 et CB1 est à même de produire un effet antinociceptif dépendant de ces contrôles descendants.

Ces travaux de thèse ont conduit à conforter que l'action antalgique du paracétamol implique un mécanisme supra-spinal dépendant de l'enzyme FAAH en condition pathologique. Plus précisément, nous avons étudié le rôle de la triade FAAH/TRPV1/CB1 au niveau de la SGPA. Nous avons découvert que le paracétamol interagissait avec une voie de signalisation cellulaire mGLUR5-PLC-DAGL responsable de la production de l'endocannabinoïde 2-AG. Ce mécanisme pourrait à la fois expliquer l'étroite collaboration existant entre les récepteurs TRPV1 et CB1 dans l'effet antalgique du paracétamol et le renforcement des voies descendantes sérotoninergiques.

Le paracétamol est donc un promédicament dont l'action cérébrale recruterait un ensemble de systèmes complexes pour médier son effet antalgique. Ce mécanisme séduisant ouvre la piste à de nouveaux antalgiques toujours plus efficaces avec des effets indésirables moindres, à l'image du paracétamol.

Abstract

Paracetamol is since its discovery controversial. Whether with respect to the mechanism of action, its side effects or effectiveness, many studies have been performed, at times contradictory. Sometimes criticized for its limited effectiveness, it has nothing to envy in contrast to other analgesics whose effectiveness are often associated with side effects. Paracetamol has proven itself to relieve low to moderate pain without side effects at therapeutic doses. This makes it drug of choice for pregnant women, infants and children. According to a report by the ANSM of the 30 top-selling active substances in France in 2013, with a total of 1.15 billion boxes, paracetamol largely dominates this ranking as its sales are over 500 million boxes. Thus it has become the analgesic and antipyretic most consumed in the world.

Today, the pharmacopoeia of analgesics is outdated; evolution of the therapeutic arsenal for 50 years is limited with few major discoveries reported. This observation leads to the need to reassess research strategies to innovate new and more effective molecules. Until now, the aim was to focus on a few molecules with high therapeutic potential in order to optimize their effectiveness without understanding their mechanisms. Now our interest is to understand the mechanisms and targets of these analgesics in order to develop more comparable molecules while limiting their adverse effects. Based on this strategy, paracetamol is a perfect candidate. Indeed, its mechanism of action is not fully known, but its effectiveness is proven. The aim of this work is to elucidate the mystery surrounding its mechanism of action and discover its targets.

The latest studies redefine paracetamol as a metabolic precursor to the origin of an active lipid derivative, called AM404. The latter is synthesized in certain regions of the brain expressing the FAAH enzyme capable of catalyzing this reaction. The mechanism thus put into play shows that paracetamol, *via* AM404, activates TRPV1 receptors and the central CB1 receptors indirectly to reinforce a central mechanism of pain relief *via* serotonergic descending pathways. However, the cerebral area concerned and the cellular mechanism involved remain unknown. Behavioral data associated with a functional imaging study unveiled several brain regions potentially involved in the action of paracetamol, including the periaqueductal gray matter. The latter sparked our interest for two reasons: one because it expresses the core triad FAAH/TRPV1/CB1; and two it also represents a crossroad of descending serotonergic pathways. Activation in the periaqueductal gray matter of the TRPV1 and CB1 receptors is adapted to produce an antinociceptive effect dependent on these descendant control systems.

This work of this thesis has led to re-affirm that the analgesic action induced by paracetamol involves a supra-spinal mechanism dependent on the FAAH enzyme in pathological conditions. Specifically, we investigated the role of the triad FAAH/TRPV1/CB1 in the periaqueductal gray matter. We found that paracetamol interacted with the cell signaling pathway mGluR5-PLC-DAGL responsible for production of the endocannabinoid 2-AG. This mechanism can explain both the close collaboration between the TRPV1 and CB1 receptors in the analgesic effect of paracetamol and the reinforcing of serotonergic descending pathways.

Paracetamol is thus a prodrug whose cerebral action involves a set of complex systems to mediate its analgesic effect. This attractive mechanism opens the track to new painkillers ever more effective with fewer side effects, reflected paracetamol mechanism.

Liste des contributions scientifiques

Communications affichées:

Dalman R, Daulhac L, Eschalier A and Mallet C. Supra-spinal FAAH is required for the anti-hyperalgesic action of paracetamol in an inflammatory pain model in mice. IXème Congrès de Physiologie, Pharmacologie et de Thérapeutique (P2T), Avril 2014, Poitiers

Dalman R*, Barrière DA*, Bernier M, Etienne M, Chapuy E, Chalus M, Traoré A, Bielicki G, Keller C., Whittingstall K, Sarret P, Mallet C, Eschalier A. The periaqueductal grey matter is a key structure in the analgesic effect of acetaminophen. *Contribution identique à l'étude. 15th World Congress on Pain (IASP), Octobre 2014, Buenos Aires.

Dalman R, Daulhac L, Eschalier A and Mallet C. Supra-spinal FAAH is required for the anti-hyperalgesic action of paracetamol in an inflammatory pain model in mice. 15th World Congress on Pain (IASP), Octobre 2014, Buenos Aires.

Dalman R, Daulhac L, Eschalier A and Mallet C. Supra-spinal FAAH is required for the anti-hyperalgesic action of paracetamol in an inflammatory pain model in mice. 14^{ème} congrès national de la Société Française d'Etude et de Traitement de la Douleur (SFETD), Novembre 2014, Toulouse.

Communications orales:

Dalman R, Barrière DA, Etienne M, Chapuy E, Chalus M, Bernier M, Whittingstall K, Sarret P, Christophe Mallet M and Eschalier A. 9e symposium national du réseau Inserm de Recherche sur la Douleur. Mars 2013, Bordeaux

Dalman R. La substance grise périaqueducal: une région cérébrale clé dans l'effet antalgique du paracétamol ? Journée des écoles doctorales. Mai 2013, Clermont-Ferrand

Publications internationales:

Dalman R., Daulhac L., Antri M., Eschalier A., and Mallet C. Supra-spinal FAAH is required for the analgesic action of paracetamol in an inflammatory context. *Neuropharmacology* (2014)

Barrière DA.*, **Dalman R.***, Bernier M., Etienne M., Chapuy E., Chalus M., Traoré A., Bielicki G., Keller C., Whittingstall K., Sarret P., Mallet C., Eschalier A. Periaqueductal grey matter is a key structure in the analgesic effect of acetaminophen. *Pain* (soumis). * contribution identique

Ferrier J., Bayet-Robert M., **Dalman R.**, El Guerrab A., Graveron-Demilly D., Chalus M., Pinguet J., Eschalier A., Richard D., Daulhac L., Marchand F., and Balayssac D. Activation of insular muscarinic M2 receptors reduces oxaliplatin-induced neuropathic pain. *The Journal of Neuroscience* (soumis).

Abréviation

20-HETE : 20-hydroxy arachidonic acid	lyso-PLC : lyso-phospholipase C
2-AG : 2-arachidonoylglycérol	MAGL : monoacylglycerol lipase
5,7-DHT : 5,7-dihydroxytryptamine	MAO : monoamine-oxydase
5HIAA : acide 5-hydroxy indole-acétique	mGLUR5 : Metabotropic glutamate receptor
5-HT : 5-hydroxytryptamine (sérotonine)	NAAA : N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase
ABHD4 : α,β -hydrolase 4	NAPE : N-arachidonoyphosphatidyléthanolamine
ACF : Adjuvant Complet de Freund	NAPE-PLD : N-acyl phosphatidyléthanolamine phospholipase
AEA : anandamide	NAPQI : N-acetyl-P-benzoquinone imine
AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens	NGF : Nerve Growth Factor (facteur de croissance des nerfs)
AM251 : antagoniste des récepteurs CB ₁	NP : neurone de projection
AM404 : N-(4-hydroxyphenyl)arachidonylethanolamide	p-AEA : phospho-anandamide
AMT : anandamide membrane transporter	pCE₅₀ : logarithme négatif de la concentration efficace médiane
ATP : adénosine triphosphate	pCPA : p-chlorophénylalanine
AUC : area under the curve (aire sous la courbe)	pCPA : p-Chlorophénylalanine
BHE : barrière hématoencéphalique	PDGF : platelet-derived growth factor (facteur de croissance des plaquettes)
BK : bradykinine	PG : prostaglandine
bpm : battements par minute	PGE₂ : prostaglandine E ₂
CB_{1/2} : récepteurs aux cannabinoïdes 1 et 2	PLA₁ et PLA₂ : phospholipase A ₁ et A ₂
CI₅₀ : concentration inhibitrice médiane	PLC : phospholipase C
COX : cyclooxygénase	PMSF : phenylmethanesulfonylfluoride (inhibiteur FAAH)
CPZ : capsazépine, antagoniste des récepteurs TRPV ₁	PTPN22 : protéine tyrosine phosphatase N22
CYP : cytochrome	RCPG : récepteur couplé aux protéines G
DAG : diacylglycerol	RVM : rostro ventral medulla
DAGLα et β : diacylglycérol lipase α et β	SB705498 : inhibiteur TRPV ₁
dl-SGPA : substance grise périaqueducule-dorsolatérale,	SGPA : substance grise périaqueducule
dm-SGPA : substance grise périaqueducule-dorsomédiane	SGPA : substance grise périaqueducule
DRGs : dorsal root ganglions (ganglions de la racine dorsale)	SNC : système nerveux central
EGF : epidermal growth factor (facteurs de croissance)	SNP : système nerveux périphérique
FAAH : fatty acid amide hydrolase	SP : substance p
FAPs : fibres afférentes primaires	TNF : tumor necrosis factor (facteur de nécrose tumorale)
GABA : gamma-aminobutyric acid	TRP : transient receptor potential
GDE1 : glycérophospho-diestérase 1	TRPA : transient receptor potential ankyrin
GP-AEA : glycerol-phosphoanandamide	TRPA₁ : T transient receptor potential ankyrin 1
HTP : hydroxytryptophane	TRPM : transient receptor potential melastatin
HVA : high voltage activated	TRPML : transient receptor potential mucoLipin
i.c.v. : voie intracérébroventriculaire	TRPP : transient receptor potential polycystin
i.p. : voie intrapéritonéale	TRPV : transient receptor potential vanilloïde
i.pl. : voie intraplantaire	TRPV₁ : transient receptor potential vanilloïde 1
i.t. : voie intrathécale	TX : thromboxane
i.v. : voie intraveineuse	URB597 : inhibiteur de l'enzyme FAAH
IL : interleukine	URB602 : inhibiteur de l'enzyme MAGL
interNI : interneurone inhibiteur	URB937 : inhibiteur périphérique de l'enzyme FAAH
IRMf : imagerie par résonance magnétique fonctionnelle	vI-SGPA : ventrolatérale-substance grise périaqueducule
KO : knock-out	WAY100635 : inhibiteur des récepteurs 5-HT _{1A}
LOX : lipoxygénase	WIN55,212-2 : agoniste des récepteurs CB ₁
LPS : lipopolysaccharides	Δ9-THC : Δ 9-tétrahydrocannabinol
I-SGPA : latérale-substance grise périaqueducule	
lysNAPE : lyso N-acyl phosphatidylethanolamine	

Sommaire

PREMIER CHAPITRE	LE PARACÉTAMOL : GÉNÉRALITÉS	1
I.	HISTORIQUE.....	3
II.	PHARMACOCINETIQUE.....	5
1.	<i>Absorption</i>	5
2.	<i>Distribution</i>	6
3.	<i>Métabolisme et élimination</i>	6
III.	UTILISATIONS CLINIQUES DU PARACETAMOL.....	7
1.	<i>Dans le traitement de la douleur</i>	7
2.	<i>Dans le traitement de la fièvre</i>	9
IV.	LE PARACETAMOL UN MEDICAMENT POPULAIRE NON DENUE DE RISQUES	10

DEUXIEME CHAPITRE	MÉCANISME ANTALGIQUE DU PARACÉTAMOL : NOUVEAU CONCEPT D'UN PROMÉDICAMENT À ACTION CENTRALE	13
I.	HISTORIQUE MECANISTIQUE DU PARACETAMOL.....	15
II.	VOIES METABOLIQUES DU PARACETAMOL : LE PARACETAMOL, UN PROMEDICAMENT	17
1.	<i>Description d'une nouvelle voie métabolique</i>	17
2.	<i>Mécanisme d'action antalgique dépendant de cette voie métabolique</i>	19
3.	<i>L'AM₄₀₄ : Effets pharmacologiques et propriétés antinociceptives</i>	20
III.	MECANISME CENTRAL : SYSTEMES DE NEUROTRANSMISSION IMPLIQUES DANS L'EFFET DU PARACETAMOL.....	24
1.	<i>Paracétamol et récepteur vanilloïde 1</i>	24
2.	<i>Paracétamol et récepteur cannabinoïde 1</i>	34
3.	<i>Paracétamol et canal calcique Cav_{3.2}</i>	45
4.	<i>Paracétamol et voies descendantes sérotoninergiques</i>	48
IV.	LES AUTRES HYPOTHESES DU MECANISME D'ACTION ANTALGIQUE DU PARACETAMOL	61
1.	<i>Le paracétamol : un AINS ? La controverse sur l'implication du système des cyclooxygénases</i>	61
2.	<i>Autres hypothèses mécanistiques</i>	66
V.	RESUME DU MECANISME D'ACTION ANTALGIQUE DU PARACETAMOL PROPOSEE : EFFET CENTRAL ET REGIONS SUPRA-SPINALES IMPLIQUEES ?	72

TROISIEME CHAPITRE	LA SUBSTANCE GRISE PÉRIQUÉDUCALE : CENTRE DE MODULATION DE LA DOULEUR ET IMPLICATION DANS L'EFFET ANTINOCICEPTIF DU PARACÉTAMOL ?	75
I.	LA SUBSTANCE GRISE PERIAQUÉDUCALE : UN NOYAU CENTRAL DANS LA MODULATION DE LA DOULEUR	77
1.	<i>Anatomie de la substance grise périaqueducale</i>	77
2.	<i>Neurochimie de la substance grise périaqueducale</i>	80
3.	<i>Rôles physiologiques</i>	81
II.	ROLE DE LA SUBSTANCE GRISE PERIAQUÉDUCALE DANS LA MODULATION DE LA DOULEUR	84
1.	<i>Mécanismes cellulaires mis en jeu dans la modulation des contrôles descendants</i>	84
2.	<i>Adaptation et plasticité de la SGPA en condition physiopathologique</i>	91
III.	LA SUBSTANCE GRISE PERIAQUÉDUCALE : UNE CIBLE POTENTIELLE DANS L'ACTION ANTALGIQUE DU PARACETAMOL ?	93
1.	<i>Etude IRMf : variation du signal BOLD de la substance grise périaqueducale après administration de paracétamol</i>	93
2.	<i>Expression des acteurs clés nécessaires à l'action antalgique du paracétamol : FAAH/CB₁/TRPV₁</i>	94
3.	<i>Activation des récepteurs TRPV₁ et CB₁ dans la substance grise périaqueducale induit une analgésie dépendant des contrôles descendants</i>	95

OBJECTIFS.....	97	
I.	LE PARACETAMOL : UN MECANISME D'ACTION CENTRALE DEPENDANT DE L'ENZYME FAAH ?.....	99
II.	ÉTUDE FONCTIONNELLE DE L'IMPLICATION DE LA SUBSTANCE GRISE PERIAQUÉDUCALE DANS L'EFFET ANTALGIQUE DU PARACETAMOL	100
III.	ÉTUDE NEUROCHIMIQUE D'UNE VOIE DE SIGNALISATION CELLULAIRE MISE EN JEU DANS LA SUBSTANCE GRISE PERIAQUÉDUCALE	101

1^{ER} ARTICLE.....	105
I. SYNTHÈSE DU 1 ^{ER} ARTICLE.....	107
1. <i>Introduction</i>	107
2. <i>Résultats</i>	108
3. <i>Conclusion et discussion</i>	108
II. INTRODUCTION.....	113
III. MATERIALS AND METHODS.....	114
1. <i>Drugs</i>	114
2. <i>Intracerebroventricular injection</i>	115
3. <i>Model of inflammation</i>	115
4. <i>Behavioral tests</i>	115
5. <i>Statistical analysis</i>	117
I. RESULTS.....	118
1. <i>Requirement of the FAAH enzyme in paracetamol action in an inflammatory pain context</i>	118
2. <i>Central but not peripheral FAAH is needed for the analgesic action of paracetamol</i>	119
3. <i>Supra-spinal FAAH is the key enzyme for paracetamol action</i>	121
4. <i>Supplementary Data</i>	122
II. DISCUSSION.....	125

2^{ÈME} ARTICLE.....	129
I. SYNTHÈSE DU 2 ^{ÈME} ARTICLE.....	131
1. <i>Introduction</i>	131
2. <i>Résultats</i>	132
3. <i>Discussion et conclusion</i>	134
II. INTRODUCTION.....	137
III. MATERIALS AND METHODS.....	138
1. <i>Animals</i>	138
2. <i>Drugs</i>	138
3. <i>Animal preparation for fMRI and ¹H MRS</i>	139
4. <i>fMRI method</i>	139
5. <i>In vivo ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMRS)</i>	141
6. <i>Surgical procedures and cerebral infusion</i>	142
7. <i>Nociceptive tests</i>	143
8. <i>c-Fos immunolabelling and counting</i>	143
9. <i>TRPV1, CB1 and FAAH co-localization</i>	144
10. <i>Statistical analysis</i>	144
IV. RESULTS.....	145
1. <i>Decrease in blood-oxygen-level dependent (BOLD) contrast and functional connectivity in the pain matrix during the AcAP challenge</i>	145
2. <i>FAAH and the CB1 and TRPV1 receptors in the PAG are involved in AcAP-induced analgesia</i>	150
3. <i>Oral AcAP enhances VL-PAG glutamate neurotransmission, which underlies an analgesic effect involving the mGluR5/phospholipase C (PLC)/diacylglycerol lipase (DAGL) pathway</i>	155
4. <i>Supplementary Data</i>	156
V. DISCUSSION.....	157
1. <i>Brain functioning and connectivity during the AcAP challenge</i>	157
2. <i>The levels of amino acids in the PAG are modified during AcAP challenge</i>	158

DONNEES COMPLEMENTAIRES NON PUBLIEES.....	161
I. INTRODUCTION	163
II. MATERIELS ET METHODES.....	163
1. <i>Induction du modèle de monoarthrite</i>	163
2. <i>Microdialyse cérébrale et spinale</i>	163
3. <i>Statistiques</i>	167
III. RESULTATS	167
1. <i>Implication de l'enzyme FAAH et du récepteur TRPV1 dans l'action antalgique du paracétamol par voie intraveineuse ou voie orale</i>	167
2. <i>Confirmation du rôle antinociceptif de l'AM404 dans la SGPA en contexte pathologique et dépendant des récepteurs TRPV1/CB1</i>	168
3. <i>Le paracétamol modifie les taux de 5-HT au niveau de la vl-SGPA et de la moelle épinière : étude de microdialyse.</i>	169
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	173
I. VALIDATION DU CONCEPT D'UN PROMEDICAMENT A EFFET CENTRAL EN CONTEXTE PATHOLOGIQUE	175
1. <i>Le mécanisme d'action antalgique du paracétamol via son bioprécurseur est conservé en contexte pathologique</i>	175
2. <i>Le paracétamol est un antalgique aux effets antalgiques strictement centraux</i>	176
3. <i>Intérêt thérapeutique des inhibiteurs de la dégradation des endocannabinoïdes dans le traitement de la douleur</i>	177
II. MECANISME DE L'EFFET ANTALGIQUE DU PARACETAMOL : UNE REGION CEREBRALE CLE ET UN MECANISME CELLULAIRE POTENTIELLEMENT IMPLIQUE	179
1. <i>La substance grise périaqueducale grise est une structure essentielle dans le mécanisme d'action antalgique du paracétamol.</i>	179
2. <i>Mécanisme cellulaire et voie de signalisation initiée au niveau de la substance grise périaqueducale.</i>	181
3. <i>Le paracétamol peut-il impliquer d'autres régions cérébrales ?</i>	184
III. LA SUBSTANCE GRISE PERIAQUEDUCALE, UN SUBSTRAT COMMUN A DE NOMBREUX ANTALGIQUES	186
PERSPECTIVES.....	189
I. PARACETAMOL : MECANISME CELLULAIRE MIS EN JEU DANS SUBSTANCE GRISE PERIAQUEDUCALE ET RENFORCEMENT DES VOIES DESCENDANTES SEROTONINERGIQUES	191
1. <i>Exploration de la cascade cellulaire mise en jeu dans la substance grise périaqueducale par le paracétamol</i>	191
2. <i>Etude du système sérotoninergiques descendant : substrat au paracétamol pour son action antalgique</i>	192
II. CONCEPT DE VECTORISATION : OPTIMISATION DE NOUVEAU PRECURSEURS ANTALGIQUES CIBLANT LA SUBSTANCE GRISE PERIAQUEDUCALE.....	197
RÉFÉRENCES.....	201

Index des illustrations

Figure 1. Structure chimique de l'acétanilide et ses dérivés : la phénacétine et le paracétamol.....	3
Figure 2. Coupure de journal provenant de l'Impartial du 18 et 19 décembre 1976.	4
Figure 3. Cinétique de la concentration plasmatique de paracétamol et ses métabolites : paracétamol-sulfate et paracétamol glucuronide.	5
Figure 4. Métabolisme du paracétamol chez un individu sain.	6
Figure 5. Les voies métaboliques du paracétamol.	16
Figure 6. Métabolisation du paracétamol en AM404.....	18
Figure 7. Cibles pharmacologiques de l'AM404.	20
Figure 8. Arbre phylogénique des TRP : « transient receptor potential ».....	24
Figure 9. Représentation des 7 sous-groupes de récepteur TRP : « transient receptor potential ».....	25
Figure 10. Schéma récapitulatif de la sensibilité aux températures et autres substances naturelles des thermosenseurs.....	25
Figure 11. Schéma structurel du récepteur TRPV1 et modulation de son activité en condition inflammatoire.	28
Figure 12. Régions cérébrales exprimant le récepteur TRPV1.	31
Figure 13. Effets pharmacologiques du métabolite du paracétamol, l'AM404, sur les récepteurs TRPV1.	33
Figure 14. Effet antinociceptif du paracétamol dépend des récepteurs TRPV1 supra-spinaux.	34
Figure 15. Principales voies intracellulaires associées aux récepteurs CB1.	36
Figure 16. Structure chimique de l'anandamide (AEA). D'après De Petrocellis et Di Marzo, 2010.	37
Figure 17. Structure chimique du 2-AG. De Petrocellis et Di Marzo, 2010.	39
Figure 18. Principales voies de synthèse des endocannabinoïdes anandamide (AEA) et 2-AG.....	40
Figure 19. Implication du récepteur CB1 dans l'effet antinociceptif du paracétamol.....	45
Figure 20. Implication des canaux Cav3.2 dans l'effet antinociceptif du paracétamol.....	48
Figure 21. Schéma explicatif du métabolisme de la sérotonine.....	49
Figure 22. Rôle des récepteurs 5-HT dans la nociception au niveau périphérique.....	52
Figure 23. Schéma général des voies descendantes sérotoninergiques.	54
Figure 24. Mécanisme des voies descendantes sérotoninergiques (A) et organisations des projections de l'axe SGPA-RVM-moelle épinière (B).	56
Figure 25. Les cyclooxygénases (COX).	61
Figure 26. Différents modes d'action inhibiteurs du paracétamol sur l'activité des COX.....	65
Figure 27. Mécanisme inhibiteur des fibres nociceptives par l'activation des récepteurs TRPA1 médullaires... ..	71
Figure 28. Vision globale de l'hypothèse du mécanisme d'action antalgique du paracétamol.....	73
Figure 29. Localisation de la substance grise périaqueducule (SGPA) chez le rat.....	77
Figure 30. Circuit des connexions entre la SGPA et les autres régions cérébrales ou médullaires.....	78
Figure 31. Résumé des systèmes biologiques modulés par les différentes colonnes de la SGPA.	81

Figure 32. Mécanisme général de désinhibition GABAergique de la SGPA par le rétrocontrôle CB1 par les RCPGq.	85
Figure 33. Schéma illustrant le mécanisme impliqué dans l'effet antinociceptif de substances endogènes ou exogènes au niveau de la SGPA.	90
Figure 34. Diagramme représentant la neuroplasticité des voies ascendantes et descendantes de la douleur lors d'une neuropathie.	93
Figure 35. Hypothèse du mécanisme d'action centrale du paracétamol au niveau de la SGPA.	103
Figure 36. Design of the different studies.	116
Figure 37. Paracetamol-induced thermal/mechanical anti-hyperalgesic and anti-allodynic effect in wild-type (FAAH+/+) but not in knock-out (FAAH-/-) mice.	119
Figure 38. Pharmacological effects of brain-permeant FAAH inhibitor URB597 or peripheral restricted FAAH inhibitor URB937 on paracetamol thermal anti-hyperalgesic effect.	120
Figure 39. Pharmacological effects of brain-permeant FAAH inhibitor URB597 or peripheral restricted FAAH inhibitor URB937 on paracetamol anti-allodynic and anti-hyperalgesic effect.	121
Figure 40. Pharmacological validation of FAAH brain involvement in paracetamol anti-hyperalgesic and anti-hyperalgesic effects via brain injection of peripheral FAAH inhibitor URB937.	122
Figure 41. Supplementary data 1 - Extended Methods Form.	123
Figure 42. Supplementary data 2 - FAAH genotype comparison in paw immersion test following a temperature gradient in naïve mice.	124
Figure 43. Supplementary data 3 - URB597 and URB937 dose effects in paw immersion and von Frey tests in the carrageenan-induced inflammatory pain model.	124
Figure 44. Effects of the oral administration of vehicle or AcAP (300 mg kg ⁻¹) on BOLD signals during a 40 min period.	146
Figure 45. Evolution of the BOLD signal from the initial baseline (Δ BOLD) in cortical structures of the pain matrix between vehicle- and AcAP-treated (300 mg kg ⁻¹) groups.	147
Figure 46. The functional connectivity in pain-related structures during the AcAP challenge highlights the involvement of the PAG in the central effect of AcAP.	149
Figure 47. Immunohistochemical localization of FAAH with CB1 and TRPV1 receptors in the rat VL-PAG according to double immunostaining in consecutive sections.	150
Figure 48. FAAH, CB1 and TRPV1 receptors in the VL-PAG are responsible for AcAP-induced mechanical and thermal analgesia.	152
Figure 49. Injection of the AcAP-metabolites pAP and AM404 into the VL-PAG induces analgesia.	154
Figure 50. Quantification of GABA and glutamate levels in the VL-PAG using 1H in vivo spectroscopy.	155
Figure 51. Involvement of the mGluR5 receptors, phospholipase C (PLC) and diacylglycerol lipase (DAGL) in the VL-PAG during AcAP-induced thermal analgesia.	155
Figure 52. Extended methods form. Checklist of experimental methodology. This table details and ensures technical and methodological quality of this study as recommended by Rice et al. (2008).	156
Figure 53. Summary of metabolic and neurophysiological pathways supporting the acetaminophen-induced-analgesia.	160
Figure 54. Mise en place dans une cadre stéréotaxique d'un rat pour l'implantation de la canule guide au niveau des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière.	164

Figure 55. Dispositif du système de microdialyse.	165
Figure 56. Implication de l'enzyme FAAH et du récepteur TRPV1 dans l'effet antalgique du paracétamol par voie intraveineuse, en contexte pathologique.	168
Figure 57. En condition pathologique, l'effet antihyperalgique de l'AM404 dépendant des récepteurs TRPV1 et CB1, dans la vl-SGPA, est conservé.	169
Figure 58. Étude de microdialyse dans la vl-SGPA pour suivre le métabolisme du paracétamol en p-aminophénol et les variations des taux de 5-HIAA suite à l'administration de paracétamol.	171
Figure 59. Influence du paracétamol sur les taux médullaires de 5-HT : étude de microdialyse spinale.	172
Figure 60. Effet de la morphine sur la substance grise périaqueducale en IRMf.	180
Figure 61. Mécanisme d'action antinociceptif de la capsaïcine administrée dans la partie ventrolatérale de la substance grise périaqueducale (vl-PAG ou vl-SGPA) via une activation des contrôles descendants.	183
Figure 62. Hypothèse des interactions des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS ou NSAIDs), au niveau de la substance grise périaqueducale, avec les contrôles descendants dans la modulation de la douleur.	187
Figure 63. Résultats issus d'une étude sur la libération médullaire de sérotonine (5-HT) provenant des contrôles descendants sérotoninergiques suite à une administration de morphine dans la substance grise périaqueducale (SGPA).	194
Figure 64. Vérification de la position de la sonde de microdialyse sur une coupe coronale de la substance grise périaqueducale (SGPA) chez le rat.	196
Figure 65. Conception de nouveaux antalgiques analogues du p-aminophénol capables de traverser la barrière hématoencéphalique (BHE) pour être métabolisé au niveau cérébral par l'enzyme FAAH en un agoniste TRPV1.	198
Figure 66. L'analogue du p-aminophénol, HMBA, à un effet antinociceptif dépendant de l'enzyme FAAH et des récepteurs cérébraux TRPV1, à l'image du paracétamol.	199

Index des tableaux

Tableau 1. Méta-analyse d'essais cliniques sur l'efficacité du paracétamol seul.	8
Tableau 2. Récapitulatif des effets indésirables les plus récemment observés.	12
Tableau 3. Résumé des effets in vivo de l'AM404.	21
Tableau 4. Fonctions physiologiques, modes d'activation et localisations des récepteurs TRPV1 à TRPV6.	27
Tableau 5. Rôle des récepteurs TRPV1 dans différents systèmes biologiques.	29
Tableau 6. Rôles des récepteurs CB1 dans différents systèmes biologiques.	43
Tableau 7. Localisations et rôles dans la nociception des différents sous-types de récepteurs 5-HT.	51
Tableau 8. Résumé des répercussions de l'inhibition de différents sous-types de récepteurs 5-HT dans l'effet antalgique du paracétamol.	60
Tableau 9. Résumé des effets centraux des récepteurs à l'adénosine A1 et A2A et de leurs fonctions au niveau médullaire.	67
Tableau 10. Récapitulatif des essais cliniques concernant la stimulation électrique profonde de la SGPA dans le traitement des douleurs chroniques.	83
Tableau 11. Résumé des régions exprimant la triade TRPV1/CB1/FAAH chez la souris C57BL/6J.	185

PREMIER CHAPITRE
LE PARACÉTAMOL : GÉNÉRALITÉS

I. Historique

Le paracétamol est né d'une erreur providentielle, ou plus exactement d'une faute d'approvisionnement. Comme souvent, une découverte thérapeutique d'importance peut être le fait d'un hasard. L'histoire du paracétamol, ou plutôt de son précurseur, nous ramène en 1886 à l'Université de Strasbourg. Le Professeur Kussmaul, du département de Médecine Interne, demande à deux assistants, Arnold Cahn et Paul Hepp, de prescrire du naphthalène à un patient souffrant de

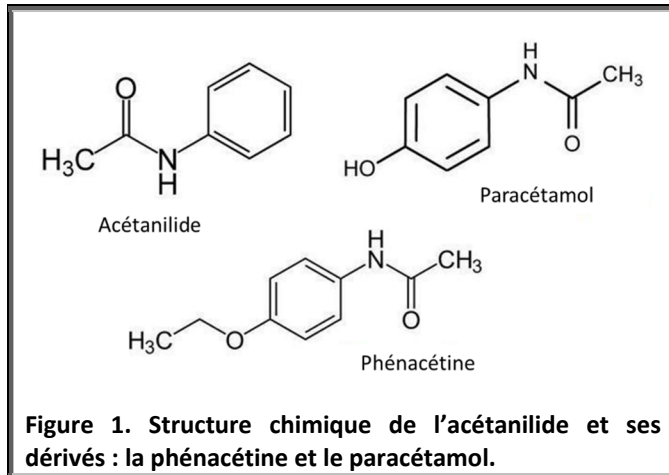


Figure 1. Structure chimique de l'acétanilide et ses dérivés : la phénacétine et le paracétamol.

parasitose intestinale. À leurs grandes surprises, le traitement n'eut que peu d'effet sur la parasitose. Par contre, il s'avère que le médicament prescrit avait un puissant effet antipyrétique. Stupéfaits, Cahn et Hepp entreprirent de mettre à jour ce mystère. Ils comprirent que le pharmacien en charge de fournir le médicament en question s'était mépris sur le traitement et aurait délivré de

l'acétanilide au lieu du naphthalène. Ainsi, ces deux assistants venaient de découvrir l'activité antipyrétique de l'acétanilide (amine aromatique : C₈H₉NO, **Figure 1**). Face à ce constat, ils s'empressèrent alors de publier leur découverte pour concurrencer l'analgésique, mais aussi l'antipyrétique en vogue à l'époque : l'antipyrine (également appelé phénazone). Ce dernier était le premier médicament au monde entièrement synthétisé, commercialisé sous le nom d'Antifébrine[®]. Ainsi débuta l'intérêt pour l'acétanilide et ses dérivés comme agent antipyrétique (Cahn and Hepp, 1886; Bertolini et al., 2006; Queneau, 2006).

En 1878, Harmon Northrop Morse de la firme Bayer entreprit de synthétiser plusieurs dérivés de l'acétanilide, notamment le paracétamol et la phénacétine (Morse et al., 1878, **Figure 1**). La première utilisation clinique du paracétamol et de la phénacétine remonte à 1887 grâce à l'étude clinique de Von Mering (1893) comparant les propriétés antalgiques, antipyrétiques ainsi que leurs toxicités respectives. Les conclusions de cette étude

Dans les années 1950, une curieuse épidémie d'insuffisance rénale sévit chez ces artisans horlogers du Jura suisse, et faute de connaissance à l'époque sur les possibilités de la dialyse rénale et la greffe de rein, l'issu était souvent fatal. Le fin mot de l'histoire était que dans ce métier de l'horlogerie, le besoin d'une attention soutenue pour effectuer des gestes précis et méticuleux provoquait régulièrement des maux de tête. Afin de remédier à cela, ces horlogers avaient la redoutable habitude de consommer allégrement de la phénacétine, ce qui était bien évidemment à l'origine de ces nombreux troubles rénaux à l'issu fatale.

mirent à mal la popularité du paracétamol. Effectivement, des résultats erronés décrivent que le paracétamol est beaucoup plus néphrotoxique que la phénacétine (Hinsberg et Treupel, 1894).

Il fallut attendre une étude de Brodie et Axelrod (1948) pour remettre en question la réputation du paracétamol. En effet, ces études démontrent que, chez des patients, la phénacétine est métabolisée en p-phénitidine (responsable de la toxicité rénale, **Figure 2**) et en paracétamol. En effet, le paracétamol est le métabolite majoritaire de l'acétanilide et de la phénacétine. Dès lors, le paracétamol réapparaît sur le marché de divers pays avec une utilité très importante en pédiatrie.

N° 30371 — 96^e ANNEE — J. A. Samedi 18 et dimanche 19 décembre 1976

L'IMPARTIAL

FEUILLE D'AVIS DES MONTAGNES / FONDÉE EN 1806

60 centimes QUOTIDIEN NEUCHÂTELOIS ET JURASSIEN PARRAISANT A LA CHAUX-DE-FONDS Administration (039) 21 11 35
Redaction

Attention à la phénacétine

« Un usage prolongé et abusif d'analgésiques contenant de la phénacétine peut provoquer des lésions graves des reins ». L'Office intercantonal de contrôle des médicaments (OICM) a décidé que les emballages de toutes les préparations contenant de la phénacétine devaient à l'avenir porter cet avertissement. Il doit également être indiqué sur les prospectus et sur les étiquettes. Les fabricants et les maisons de distribution se sont d'autre part engagés volontairement à inclure cette mention dans leur publicité.

Jusqu'ici, les modes d'emploi de ces médicaments portaient, en règle générale, l'indication que « ces médicaments ne doivent pas être pris en doses plus élevées sans consultation préalable d'un médecin ». Un délai a été accordé aux fabricants jusqu'à la fin du mois d'octobre 1977, pour leur permettre d'utiliser les emballages, prospectus et étiquettes déjà imprimés.

Le directeur de l'OICM, M. Peter Fischer, a déclaré que cette innovation constituait « un pas important ». Il n'est pas exclu que dans un avenir proche, toute publicité pourrait être interdite en matière d'analgésiques contenant de la phénacétine. Une telle interdiction devrait toutefois être basée sur des données scientifiques parfaitement établies. A ce sujet, M. Fischer a renvoyé aux recherches du professeur bâlois Ulrich C. Dubach, dont les résultats seront connus l'été prochain.

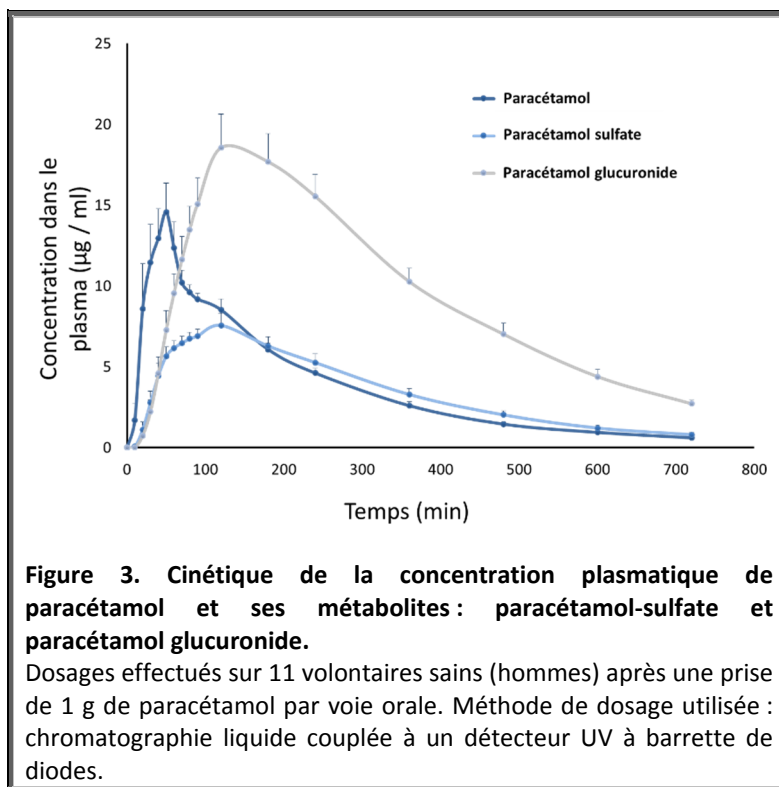
Le transfert des analgésiques à base de phénacétine de la liste D à la liste C de la réglementation OICM dépend des conclusions de ces études. Ces préparations seraient alors vendues en pharmacie exclusivement et non plus dans les drogueries. La publicité serait également interdite. Les milieux économiques concernés ont pu se défendre jusqu'ici contre de telles mesures. (ats)

Figure 2. Coupure de journal provenant de l'Impartial du 18 et 19 décembre 1976.

II. Pharmacocinétique

1. Absorption

L'absorption du paracétamol suit une cinétique du 1^{er} ordre par diffusion passive (Clissold, 1986). La bonne absorption du paracétamol s'explique par son pKa proche de 9,5 avec une forme non ionisée dans la lumière du tube digestif, ce qui facilite son assimilation. Il est également possible d'utiliser la voie rectale avec une vitesse d'absorption presque similaire à celle de la voie orale. Cette voie d'administration représente des avantages chez les enfants et les personnes dans le coma pouvant montrer des difficultés lors d'un traitement par voie orale. L'absorption du paracétamol après une prise orale est presque intégrale et réalisée principalement au niveau intestinal. La vitesse d'absorption est rapide et indépendante de la dose ingérée. L'absorption est influencée par la vidange gastrique (Clissold, 1986). Dans les cas de patient ayant une vidange gastrique lente,



l'absorption par le petit intestin est retardée (Heading et al., 1973). En effet, l'environnement gastrique étant acide, le paracétamol reste sous forme ionisée (pKa 9,5). La vitesse d'absorption dépend également de la forme galénique. En effet, un comprimé effervescent montre une rapidité d'absorption et d'efficacité plus intéressante par rapport à des comprimés (Peterson et Rumack, 1978; Rygnestad et al., 2000).

Le pic plasmatique chez l'homme (**Figure 3**) varie entre 15 min et 60 min pour les cas les plus

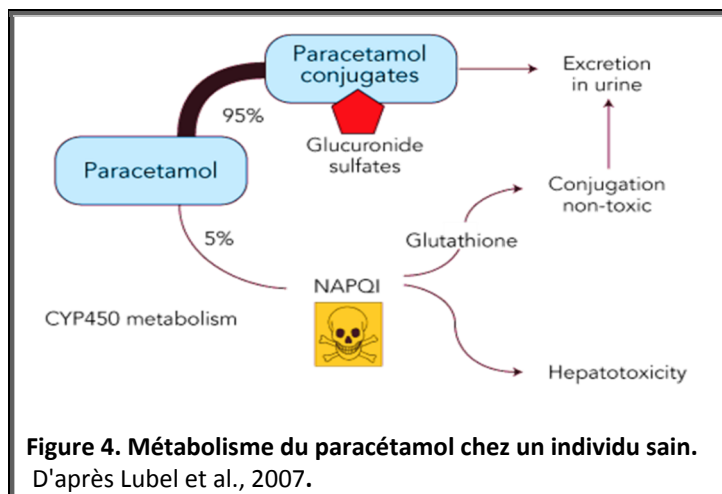
rapides et entre 2h et 3h pour les plus lents. Les variations du pic plasmatique dépendent de la voie d'administration et de la forme galénique utilisées (Clissold, 1986; Bannwarth et al., 1992; Rygnestad et al., 2000). Le temps nécessaire pour diminuer de moitié la concentration plasmatique de paracétamol (temps de demi-vie) varie entre 1h30 et 2h30 chez l'homme en condition normale (Prescott, 1980; Clissold, 1986).

2. Distribution

Le paracétamol diffuse rapidement et très largement dans les compartiments liquidiens de l'organisme sauf dans les graisses, selon un modèle ouvert à deux compartiments. Son volume de distribution est de 0,8 à 1,4 l/kg, et sa biodisponibilité est de 0,63, 0,89 et 0,87 après administration des doses respectivement de 500 mg, 1000 mg et 2000 mg (Rawlins et al., 1977; Clissold, 1986). Les concentrations plasmatiques varient selon les sujets et les conditions d'administration. Le paracétamol est très faiblement lié aux protéines plasmatiques notamment à l'albumine (5 à 20%), mais cette liaison augmente en cas de surdosage (Gazzard et al., 1973). Il faut noter que le paracétamol passe aisément la barrière hématoencéphalique (Bannwarth et al., 1992). En effet, des quantités équivalentes sont retrouvées entre le liquide céphalorachidien et le plasma chez la souris. Le dosage du paracétamol cérébral et plasmatique, 2h après administration par voie intraveineuse (100 mg/kg, i.v.), est effectué avec une concentration de 5,79 µg/ml dans le cerveau et de 7,83 µg/ml dans le plasma (Fukuda et al., 2005). De même chez l'homme, des concentrations élevées de paracétamol sont retrouvées dès 20 minutes après traitement dans le liquide céphalorachidien avec un pic à 4h post traitement (Bannwarth et al., 1992).

3. Métabolisme et élimination

À doses thérapeutiques, le paracétamol est presque totalement métabolisé au niveau hépatique (90%) grâce aux systèmes enzymatiques microsomaux (**Figure 4**). Ces systèmes



conjuguent la fonction phénol en donnant des formes glucuroconjuguées (60-80%) et sulfoconjuguées (20-30%, **Figure 3**). Ces formes inactives, qui représentent plus de 95% des métabolites, sont hydrosolubles et excrétées par le rein (Rawlins et al., 1977). Une faible partie inchangée est directement excrétée dans les urines (5%).

Une fraction minimale (3-5%) sera métabolisée *via* le cytochrome P450 (principalement par l'isoforme 3A4) à dose thérapeutique. En cas de plus forte dose, les isoformes CYP-2E1 et CYP-2D6 prennent le relais pour former un intermédiaire électrophile hautement réactif et toxique : le N-acétyl-p-benzoquinone imine (NAPQI). Le NAPQI est ensuite conjugué au glutathione hépatique donnant lieu à des conjugués de mercaptate, avant élimination dans l'urine. Ces conjugués sont

retrouvés en quantité infime à dose thérapeutique (Prescott, 2000a, 2000b; Hazai et al., 2002). En cas de surdosage de paracétamol, les voies de sulfo- et glucoronoconjugaison sont saturées et favorisent alors la voie de formation du NAPQI. Ce composé est retrouvé en excès induisant de sévères lésions au niveau hépatique, responsable de l'hépatotoxicité du paracétamol (Prescott, 2000a, 2000b; Hazai et al., 2002). Ces effets hépatotoxiques du paracétamol sont détaillés dans le paragraphe « **1^{er} Chap.IV. Le paracétamol un médicament populaire non dénué de risques** ».

III. Utilisations cliniques du paracétamol

1. Dans le traitement de la douleur

Le paracétamol (*acetaminophen* pour les États-Unis et le Canada) est un antalgique antipyrétique non salicylé, utilisé couramment pour le traitement **des douleurs légères à modérées**, qu'elles soient aiguës ou chroniques. Le paracétamol est un antalgique de palier I pouvant être utilisé seul ou en association. En effet, cette molécule est préconisée seule pour des douleurs faibles à modérées, faisant suite par exemple à des actes chirurgicaux mineurs (**Tableau 1**). En cas de douleurs plus intenses, la place du paracétamol devient celle d'un co-adjurant associé à d'autres molécules analgésiques. Plusieurs modes d'administration lui sont reconnus (intraveineuse, rectal, oral), l'utilisation par voie orale (Dafalgan[®], Doliprane[®], Efferalgan[®]) étant la plus courante. L'administration sous forme de suppositoire est plutôt dédiée à une utilisation pédiatrique, mais reste intéressante en présence de vomissements. Le paracétamol peut être également administré par voie intraveineuse (Perfalgan[®]), augmentant ainsi son efficacité et réduisant son délai d'action. En contrepartie, sa durée d'efficacité est considérablement réduite. L'administration intraveineuse est souvent réservée au milieu hospitalier pour le traitement des douleurs post-opératoires (extraction dentaire, amygdalectomie, césarienne...). Récemment, une nouvelle voie d'administration buccale/transmuqueuse émerge avec des effets plus rapides et une meilleure efficacité, cette voie est cependant en cours de développement (Pickering et al., 2014). La posologie préconisée est de 1 g toutes les 4 à 6h, sans dépasser 3 à 4 g par jour chez l'adulte. Son efficacité lui permet de réduire les doses des autres antalgiques utilisés tels que les opioïdes ou les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), afin de limiter les effets indésirables de ces derniers (Tzortzopoulou et al., 1996; Duggan et Scott, 2009; Macario et Royal, 2011).

Tableau 1. Méta-analyse d'essais cliniques sur l'efficacité du paracétamol seul. $ES = \frac{\text{moyenne groupe traité} - \text{moyenne groupe contrôlé}}{\text{déviati on standard du groupe contrôlé}}$
 ES : 0,2 : variation faible, 0,5 : variation modérée, 0,8 : grande variation. **NNT** = nombre de patients ayant un soulagement de la douleur dans le groupe paracétamol (\pm association) par rapport au groupe contrôle (placebo ou paracétamol seul). **RB** = bénéfice relatif : ratio entre les patients avec un soulagement de la douleur par rapport au groupe contrôle. **AINS** : anti-inflammatoires non stéroïdiens. D'après Graham et al., 2013.

Pathologies douloureuses	Groupes comparés	Efficacité	Résultats	Références
Arthrose	Paracétamol vs. Placebo	+ Effet léger	ES = 0,21 Moins efficace que les AINS Moins risqué que les AINS	Zhang et al., 2004 (méta-analyse) Towheed et al., 2006 Machado et al., 2015 (méta-analyse)
Arthrite rhumatoïde	Paracétamol vs. ibuprofen	+/-	Sur 54 patients l'ibuprofen (37%) est préféré au paracétamol (13%)	Wienecke and Gøtzsche, 1996
Post-opératoire	Paracétamol vs. Placebo	+	Soulagement de la douleur = 50% 500 mg : NNT = 3,5 ; RB = 1,9 600-650 mg : NNT = 4,6 ; RB = 2,4 975-100 mg : NNT = 3,6 ; RB = 2,7	Toms et al., 2008
Chirurgie dentaire	Paracétamol vs. Placebo	+	Soulagement de la douleur = 50% <1000 mg : NNT = 6,0 ; RB = 1,9 1000 mg : NNT = 3,0 ; RB = 4,2	Weil et al., 2007
Post-partum	Paracétamol vs. placebo	+	Soulagement de la douleur suffisante 1000 mg : NNT = 3,0 ; RB = 2,4 500-650 mg : NNT = 4,0 ; RB = 1,9	Chou et al., 2010
Migraine	Paracétamol vs. placebo	+	Diminution ou absence de douleur 1000 mg : 52% des patients soulagés (contre 32% pour le groupe placebo, $p = 0,001$)	Prior et al., 2010
Lombalgie	(aucune donnée)	-	Non recommandé	Forde et al., 2007
	Paracétamol/quotidien vs. Paracétamol/à la demande vs. placebo	-	Inefficace, hazard ratio : - Quotidien vs placebo = 0,99 - A la demande vs. Placebo = 1,05 - Quotidien vs à la demande = 1,05	Williams et al., 2014 Machado et al., 2015 (méta-analyse)
	(aucune donnée)	+	Recommandé pour le traitement de première intention	Chou et al., 2007 Savigny et al., 2009
Douleur cancéreuse	Paracétamol + opioïde vs. placebo + opioïde	-	Aucun bénéfice du paracétamol (4 g) ou en intraveineux (1 g) vs. placebo en accompagnement d'un traitement avec les opioïdes	Israel et al., 2010 Tasmacioglu et al., 2009
	(aucune donnée)	+/-	Efficacité en association avec des opioïdes	Christo and Mazloomdoost, 2008 Graham et al., 2013

2. Dans le traitement de la fièvre

Les propriétés antipyrétiques du paracétamol en particulier dans le domaine pédiatrique sont très appréciées et en font une molécule de première intention. Une revue de Temple et al. (2013), incluant 13 études cliniques, avec 3155 enfants de moins de 12 ans présentant une fièvre (température de base comprise entre 38,9 et 39,3°C), montre un effet antipyrétique du paracétamol. Pour une dose comprise entre 10-15 mg/kg, une diminution de la température corporelle maximale de 1,5°C est observée pendant 4 heures. L'utilisation d'une dose plus élevée (20-30 mg/kg) induit une diminution pouvant atteindre - 2,1°C. D'autres études comparatives avec l'AINS de référence dans le traitement de la fièvre, l'ibuprofène, exposent une efficacité équivalente, voire meilleure, de ce dernier par rapport au paracétamol (Olive, 2006; Pierce et Voss, 2010).

Jusqu'à présent, l'effet antipyrétique du paracétamol était justifié par son action inhibitrice sur les cyclooxygénases (COX, Ayoub et al., 2004). Mais contrairement aux AINS, le paracétamol peut réduire la température corporelle basale chez l'animal (Van Tittelboom and Govaerts-Lepicard, 1989; Dippel et al., 2003), effet rarement rencontré chez l'humain (Van Tittelboom and Govaerts-Lepicard, 1989; Denes et al., 2002; van Breda et al., 2002). Le paracétamol a donc chez l'animal **un potentiel effet hypothermisant** indépendamment de son effet antipyrétique. Mais cet effet n'est pas justifié chez l'homme.

Une utilisation plus insolite de la propriété hypothermisante du paracétamol est parfois employée dans le milieu du sport. Il semblerait que de faibles doses de paracétamol puissent améliorer les performances sportives (Burtscher et al., 2013). Une étude clinique montre que l'augmentation de la température corporelle résultant d'une course à pied de 20 min est moins importante chez les sujets ayant reçu une faible dose de paracétamol (500 mg vs traitement placebo, $p = 0,004$). Une augmentation de la fréquence cardiaque (battements par minute : bpm) dans le groupe paracétamol par rapport à un traitement placebo est également observée (paracétamol : 175,7 bpm vs placebo : 171,7 bpm ; $p = 0,02$). Un prolongement du temps de course de 2,3 min est noté chez le groupe paracétamol, mais aucune significativité n'est retrouvée causée par un effectif réduit et une trop faible dose de paracétamol (Burtscher et al., 2013). Une autre étude utilisant des doses plus élevées de paracétamol (1500 mg) observe que sur un parcours de 16,1 km des cyclistes recevant du paracétamol effectuent le circuit plus rapidement que le groupe placebo (Mauger et al., 2010). Cependant, le possible potentiel du paracétamol à améliorer les performances sportives peut aussi s'expliquer par une meilleure tolérance à la douleur des sujets sous traitement. Le paracétamol n'est ni conseillé ni préconisé pour l'amélioration des performances sportives. Toutefois, il n'est pas listé dans les produits potentiellement dopants par l'agence française de lutte contre le dopage.

IV. *Le paracétamol un médicament populaire non dénué de risques*

Le paracétamol est l'un des médicaments les plus couramment utilisés. Il est particulièrement apprécié pour des utilisations pédiatriques. En raison de son **bon ratio bénéfice/risque**, il représente un des seuls recours dans le traitement de la douleur chez la femme enceinte. Le paracétamol est utilisé par de nombreux patients **sans appréhension et avec l'assurance** d'une efficacité sans effet indésirable. Néanmoins, ce médicament n'est pas dénué d'effets indésirables. Les cas les plus fréquents d'intoxication au paracétamol sont liés à l'ingestion d'une dose excessive conduisant à une « *overdose* » parfois létale, causée par une hépatite fulminante (Josephy et al., 2005, Cf. **1^{er} Chap.III.3. Métabolisme et élimination**). La dose toxique en prise aiguë chez l'enfant est de 100 mg/kg et chez l'adulte cette dose est de 125 mg/kg, correspondant à une prise d'environ 10 à 14 g (Dart et al., 2006; Calvino, 2009). En France, la fréquence des intoxications au paracétamol de ces 20 dernières années était comprise entre 2% et 7% (Adnet et al., 2005). Aux États-Unis, les intoxications au paracétamol représentent en moyenne 56 000 admissions en urgence, 26 000 hospitalisations et 450 morts par an (Amar and Schiff, 2007). Il faut savoir que les intoxications au paracétamol peuvent être de nature **accidentelle** ou **délibérée**. Un **surdosage involontaire** peut résulter d'une automédication avec de multiples médicaments contenant du paracétamol. Les doses cumulées sont responsables de ces empoisonnements. Le paracétamol est également la première cause de défaillance hépatique lors de greffes de foie. Dans certains cas, il peut être toxique à doses normales en cas d'alcoolisme ou d'hépatite chronique, couplé à certains traitements, mais aussi chez l'enfant ou la personne âgée (Amar and Schiff, 2007). **La prise délibérée** d'une dose létale de paracétamol est à l'origine de nombreux **suicides**, puisque sur la liste des substances employées lors de suicide le paracétamol est en tête de liste. À titre d'exemple, **35% des cas recensés de suicide** à l'hôpital de Penang en Malaisie sont dû à une prise massive de paracétamol (Fathelrahman et al., 2008). En effet, le paracétamol fait partie de la liste des 200 substances chimiques et toxicologiques retrouvées dans les cas d'intoxications létales (Musshoff et al., 2004). Pour limiter les risques de surdosage, la quantité de paracétamol commercialisée a été limitée à 8 g par boîte (8 comprimés de 1000 mg ou 16 comprimés de 500 mg, Gunnell et al., 1997; Bateman, 2009, 2014; Hawton et al., 2013).

Lors d'un **surdosage en paracétamol**, celui-ci conduit à une saturation des deux voies principales de métabolisation (glucurono- et sulfoconjugaison). Il s'ensuit une hyperproduction de NAPQI. Si dans des conditions normales, la NAPQI est entièrement liée au glutathion et n'est alors pas toxique, son excès de production conduit à une saturation du glutathion et la NAPQI libre présente une toxicité hépatique (Cf. **1^{er} chap.III.3. Métabolisme et élimination**). **L'antidote** alors utilisé est la **N-acétylcystéine** (ex. Mucomyst®, Exomuc®...). Le mécanisme de la N-acétylcystéine implique un accroissement de la régénération du glutathion, qui permet alors de restaurer les réserves afin de pallier à la déplétion induite par l'intoxication. La voie physiologique de détoxication de l'excès de NAPQI est alors restaurée limitant l'intoxication (Rumack, 1983; Bunchorntavakul and Reddy, 2013).

Ces dernières années, le paracétamol a fait l'objet de quelques études concernant de **nouveaux effets indésirables plus rarement rencontrés (Tableau 2)**. Ces effets recensés sont surtout provoqués par **des prises régulières de paracétamol**, en particulier chez les femmes enceintes. Mais en aucun cas, il n'est rapporté que la prise occasionnelle de paracétamol à la dose préconisée est un risque. Une récente revue très médiatisé de Roberts et al. (2015) à cependant soulevé de nombreuses questions quant aux effets indésirables du paracétamol dont la mortalité, les effets cardiovasculaires, gastro-intestinaux et rénaux. Cette étude britannique montre qu'au bout de quelques semaines de prise continue, il peut y avoir une toxicité surtout si on prend des doses élevées.

Tableau 2. Récapitulatif des effets indésirables les plus récemment observés.

Contexte	Effectifs	Effets observés	Références
Prise régulière de paracétamol durant la grossesse et effet sur l'enfant	64322 nouveaux-nés (entre la naissance et l'âge de 7 ans)	Augmentation des risques de : - Déficit de l'attention accompagné d'hyperactivité (hazard ratio = 1,29) - Trouble hyperkinétique (hazard ratio = 1,37)	Liew et al., 2014
Incidences d'une exposition répétée au paracétamol (< 2/jours) sur les défaillances hépatiques	895 enfants (3,5 à 15,2 ans)	Augmentation des défaillances hépatiques chez les enfants ayant un historique d'exposition répétée au paracétamol	Leonis et al., 2013
Effet hypotensif du paracétamol (1 g) lors d'une administration en i.v. (en service de réanimation)	127 patients inclus	Incidence d'une hypotension chez les patients : 1,33% 20 hypotensions survenues sur 127 patients	Mrozek et al., 2009
Relation entre expositions au paracétamol pendant la grossesse et la survenue pour l'enfant de cryptorchidie .	3184 femmes enceintes	L'utilisation de paracétamol chez la femme enceinte dans la seconde période de grossesse (14-22 mois) augmente le risque de survenue d'une cryptorchidie congénitale avec un odd ratio de 2,12	Snijder et al., 2012
Relation entre l'utilisation répétée de paracétamol et l'apparition d'asthme	664 individus asthmatiques et 910 non-asthmatiques	- Relation positive entre la prise de paracétamol et la survenue de crise d'asthme Les odds ratio sont de : - 1,06 pour une utilisation occasionnelle - 1,22 pour utilisation mensuelle - 1,79 pour une utilisation hebdomadaire - 2,38 pour une utilisation quotidienne	Shaheen et al., 2000 Henderson et Shaheen, 2013
Relation entre le paracétamol et le risque d'autisme (théorie encore hypothétique)	Non applicable	Il semble y avoir une relation entre l'utilisation de paracétamol pendant le dernier semestre de la grossesse ou chez le nouveau-né et la survenue d'autisme	Schultz et al., 2008 Becker et Schultz, 2010
risque relatif sur la mortalité, les effets cardiovasculaires, gastro-intestinaux et rénaux	Méta-analyse des effets indésirables dû à une utilisation du paracétamol à dose thérapeutique	Mortalité : le risque relatif passe de 0,95 à 1,63 lorsque les doses du médicament étaient progressivement augmentées Cardiovasculaire : le risque relatif évolue de 1,19 à 1,68 Gastro-intestinale : augmentation des risques relatifs de 1,11 à 1,49 Rénale : augmentation des accidents rénaux et diminution du taux de filtration glomérulaire	Roberts et al., 2015

DEUXIÈME CHAPITRE

MÉCANISME ANTALGIQUE DU

PARACÉTAMOL : NOUVEAU CONCEPT

D'UN PROMÉDICAMENT À ACTION

CENTRALE

1. Historique mécanistique du paracétamol

Le paracétamol a longtemps été reconnu comme un produit proche des AINS, antalgiques à action périphérique agissant par inhibition des COX. À l'heure actuelle, cette hypothèse est très controversée. Malgré tout, la définition du paracétamol en tant qu'« analgésique périphérique » est encore enseignée au travers d'ouvrages de pharmacologie de référence pourtant récents (Landry et Gies, 2014). La réalité est que **le paracétamol est un modeste inhibiteur des COX** dans des préparations *in vitro*. Les études *in vivo* tendent à montrer un effet inhibiteur plus marqué vis-à-vis des COX centrales (Flower et Vane, 1972; Ayoub et al., 2006).

Néanmoins, des études ont fait un rapprochement entre l'effet antalgique du paracétamol et un système physiologique central impliqué dans la modulation de la douleur : **la sérotonine** ou la 5-HT (pour 5-hydroxytryptamine, Tjølsen et al., 1991; Pini et al., 1996). Dès lors, les premières études sur l'hypothèse mécanistique d'une action antalgique du paracétamol supposent **un effet central via une modulation de la 5-HT** (Pelissier et al., 1996; Bonnefont et al., 2003b). Cependant, ce dernier n'a que peu d'affinité pour les récepteurs sérotoninergiques (Raffa et Codd, 1996), ce qui suggère l'éventualité d'un mécanisme **d'action indirect via un bioprécurseur**.

Parmi les nombreuses voies métaboliques ou de dégradation du paracétamol (**Figure 5**), Högestätt et al. (2005) décrivent la formation d'un nouveau composé du paracétamol nommé **AM404** pour N-(4-hydroxyphenyl)arachidonoyléthanolamide. Ce dernier serait principalement formé au niveau supra-spinal grâce à **l'enzyme Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH, Cf. 1^{er} Chap.II. Voies métaboliques du paracétamol : le paracétamol, un promédicament)**. L'AM404 est un composé structurellement proche des endocannabinoïdes et des endovanilloïdes dont il partage quelques-unes de leurs propriétés pharmacologiques. Parmi ces propriétés, on peut noter qu'il est à la fois **un activateur des récepteurs « Transient Receptor Potential Vanilloid-1 » (TRPV1)** (Zygmunt et al., 2000; Högestätt et al., 2005) et **un inhibiteur de la recapture des endocannabinoïdes** (Beltramo et al., 1997). Plus récemment, il a été démontré que le canal **Cav3.2** était modulé indirectement par l'AM404 *via* son action sur le récepteur TRPV1 (Kerckhove et al., 2014).

Grâce à ces caractéristiques, **l'AM404 issu du paracétamol renforcerait les voies sérotoninergiques descendantes** inhibant la transmission du message douloureux au niveau de la moelle épinière (Mallet et al., 2008, 2010; Kerckhove et al., 2014). Les rôles de ces cibles pharmacologiques et leurs éventuelles implications dans le mécanisme d'action antalgique du paracétamol seront expliqués plus en détail dans le paragraphe « **2^{ème} Chap.III. Mécanisme central : systèmes de neurotransmission impliqués dans l'effet du paracétamol** ».

MÉCANISME ANTALGIQUE DU PARACÉTAMOL : NOUVEAU CONCEPT D'UN PROMÉDICAMENT À ACTION CENTRALE

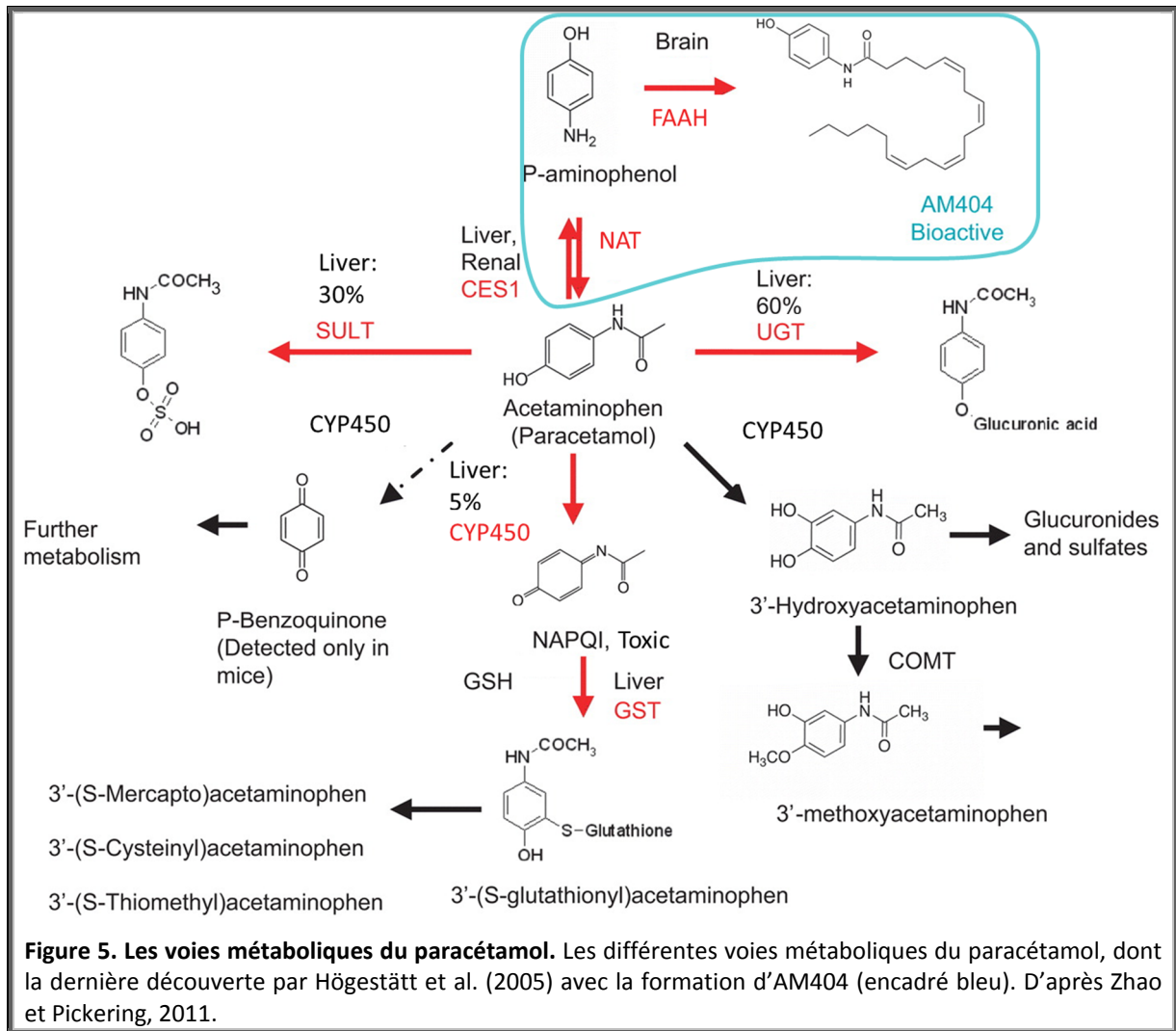


Figure 5. Les voies métaboliques du paracétamol. Les différentes voies métaboliques du paracétamol, dont la dernière découverte par Högestätt et al. (2005) avec la formation d'AM404 (encadré bleu). D'après Zhao et Pickering, 2011.

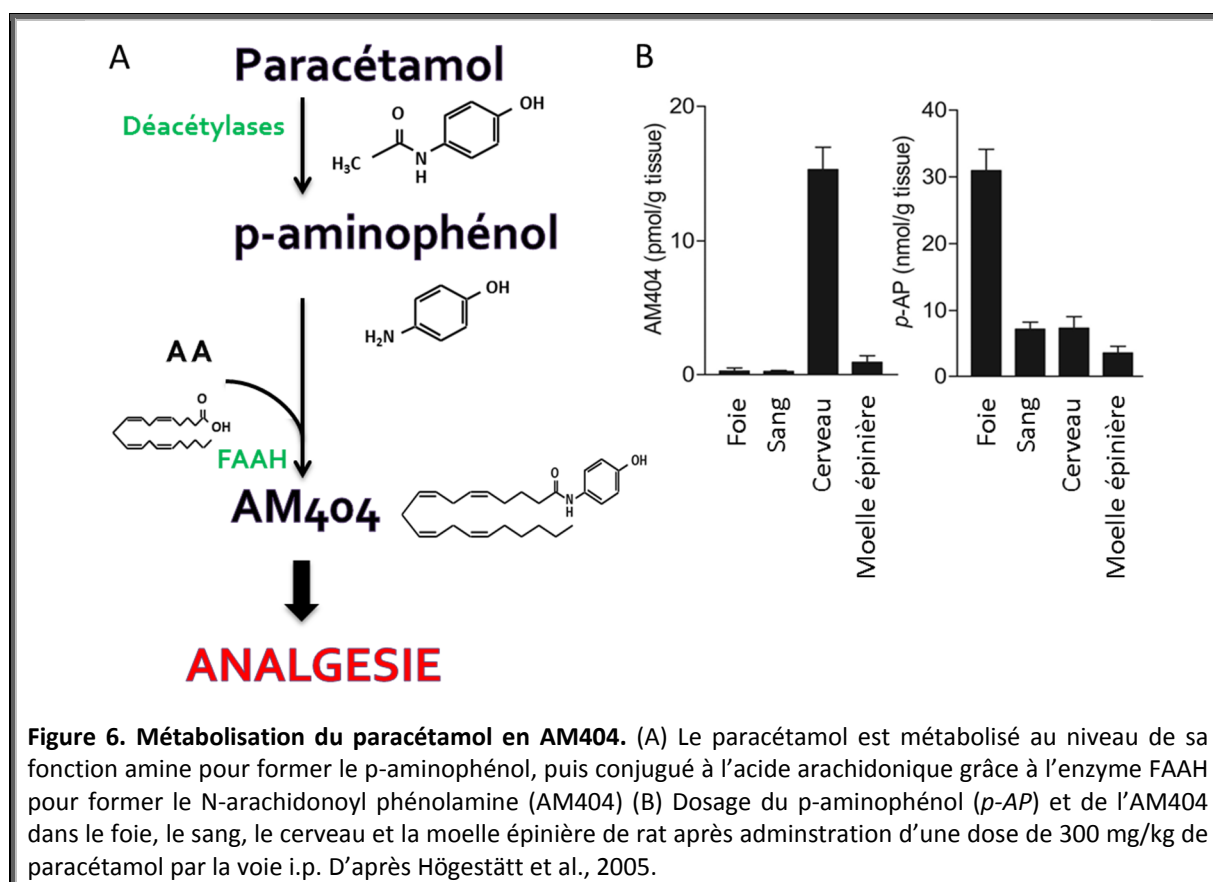
II. Voies métaboliques du paracétamol : le paracétamol, un promédicament

1. Description d'une nouvelle voie métabolique

L'action du paracétamol implique un renforcement des contrôles descendants sérotoninergiques. Cependant, ce dernier n'a pas d'effet direct sur les récepteurs sérotoninergique, se qui amène la question de la participation d'un autre acteur. Une partie de la réponse est apportée par l'article de Högestatt et al. (2005), montrant **une nouvelle voie métabolique du paracétamol**. Le paracétamol est déacétylé au niveau hépatique en une amine primaire : le p-aminophénol. Ce dernier composé diffuse aisément au travers de la barrière hématoencéphalique. Au niveau cérébral, l'enzyme FAAH va catalyser l'association de l'acide arachidonique au niveau de l'amine primaire du p-aminophénol pour former l'AM404 (**Figure 6A**).

Des données de l'équipe d'Högestatt et al. (2005) ont montré que :

- Vingt minutes après administration de doses croissantes de paracétamol chez le rat (30, 100 et 300 mg/kg, voie i.p.), il y a une formation de p-aminophénol majoritairement au niveau hépatique, et une **formation d'AM404 principalement au niveau cérébral** (Högestatt et al., 2005, (**Figure 6B**)).
- Inversement, l'utilisation d'un inhibiteur de l'enzyme FAAH (PMSF) ou une délétion génétique pour l'enzyme FAAH (souris **FAAH^{-/-}**), bloque la formation d'AM404 cérébrale chez ces animaux
- Sur une culture de **cellules hépatique de rat**, l'incubation avec du paracétamol (100 µM) permet **la formation de p-aminophénol**, mais **pas d'AM404**.
- Dans une culture de **cellules issues de cerveau de rat**, l'incubation avec du **p-aminophénol** (10 µM) montre la **formation d'AM404**, tandis que l'incubation avec **le paracétamol** (100 µM) **ne permet pas de retrouver de l'AM404**.
- L'incubation de p-aminophénol avec **d'un inhibiteur de l'enzyme FAAH (PMSF)** dans cette même culture de cellules cérébrales de rat ou l'utilisation d'une culture de cellules cérébrales issues des souris **FAAH^{-/-}** montre **l'absence de synthèse d'AM404**.



Ainsi, ces résultats nous apportent deux informations primordiales : (1) il y a formation de p-aminophénol dans le foie à partir de paracétamol, (2) L'AM404 est exclusivement formé au niveau supra-spinal, dépendamment de l'enzyme FAAH. Ainsi, le paracétamol est un **promédicament** dont le métabolite actif l'**AM404** est spécifiquement formé au **niveau supra-spinal**.

La formation d'AM404 exclusivement au niveau supra-spinal est cependant contredite par les données de Ruggieri et al. (2008). En effet, cette équipe retrouve de l'AM404 au niveau plasmatique suite à l'administration systémique d'une dose de paracétamol (400 mg/kg, i.p.). Toutefois, la dose utilisée de paracétamol est particulièrement élevée, ce qui peut expliquer la formation périphérique d'AM404 qui serait non spécifique. Cette possibilité n'est d'ailleurs pas exclue par Högestätt et al. (2005). Ces travaux montrent tout d'abord que l'incubation d'une dose de paracétamol suffisante pour induire la production d'AM404 sur des cellules cérébrales en culture ne permet pas, à cette même dose, de produire de l'AM404 dans une culture de cellule hépatique. Cependant, l'utilisation d'une dose 10 fois plus élevée de paracétamol permet la formation d'AM404 non spécifique au niveau des cellules hépatiques en culture. Cette question du rôle supra-spinal de l'AM404 sera discutée dans le 1^{er} article.

2. Mécanisme d'action antalgique dépendant de cette voie métabolique

L'hypothèse avancée par l'équipe d'Högestätt et al. (2005) est séduisante car elle justifie à la fois un effet indirect du paracétamol *via* un bioprécurseur et confirme son action centrale. Mais en aucun cas, il n'a été montré que l'effet antinociceptif du paracétamol dépendait de ce métabolisme. Suite à ces travaux, notre laboratoire a contribué à mettre en évidence que cette nouvelle voie métabolique est bien impliquée dans l'effet antalgique du paracétamol. En 2008, l'article de Mallet et al. a montré que l'effet antinociceptif du paracétamol était dépendant de l'enzyme FAAH, suggérant un effet dépendant de la formation d'AM404. En effet, l'utilisation de deux inhibiteurs différents de l'enzyme FAAH (PMSF inhibiteur non spécifique et URB597 inhibiteur spécifique) altère l'effet antinociceptif du paracétamol sur les 2 phases du test au formol et sur le test de pression de la patte. En 2010, l'implication de cette voie a été confirmée. L'effet antalgique du paracétamol sur le test au formol est inhibé chez les souris ayant une délétion génétique de l'enzyme FAAH (FAAH^{-/-}, Mallet et al., 2010). L'administration du métabolite intermédiaire du paracétamol, le p-aminophénol, présente un effet antinociceptif équivalent à celui du paracétamol sur trois différents tests (von Frey, tail immersion et formol). Et, à l'image du paracétamol, une délétion génétique (souris FAAH^{-/-}) ou une inhibition pharmacologique de l'enzyme FAAH (PMSF, 10 mg/kg, i.p.) prévient l'effet antinociceptif du p-aminophénol (Barrière et al., 2013). **L'ensemble de ces données redéfinit le paracétamol comme un promédicament dont la clé de son effet antalgique serait l'AM404.** Ce nouveau concept lui confère un profil original dont la complexité explique peut-être le mystère qui entoure son mécanisme d'action. Il reste encore à comprendre quelles sont les cibles de l'AM404 reliées à l'effet antalgique du paracétamol, mais aussi à connaître les propriétés de ce médiateur lipidique, dont de possibles effets antalgiques.

3. L'AM404 : Effets pharmacologiques et propriétés antinociceptives

L'AM404 serait donc le **composé actif issu du métabolisme du paracétamol**. Cette molécule, en dehors de son lien avec le paracétamol, a fait l'objet de divers articles. Ce lipoaminoacide est un composé synthétique proche des lipides endogènes tel que l'anandamide (AEA). Ses effets pharmacologiques décrits dans le Tableau 3 (anxiolytique, locomoteur, hypothermie, analgésie) se rapprochent de ceux des endocannabinoïdes. Ces actions sont médiées par différentes cibles (**Figure 7**), car il est connu comme étant un inhibiteur du transport de l'AEA (« *anandamide membrane transporter* » : AMT), qui permet la capture de l'AEA pour sa dégradation. Il peut également **activer les récepteurs TRPV1** (Beltramo et al., 1997; Zygmunt et al., 2000).

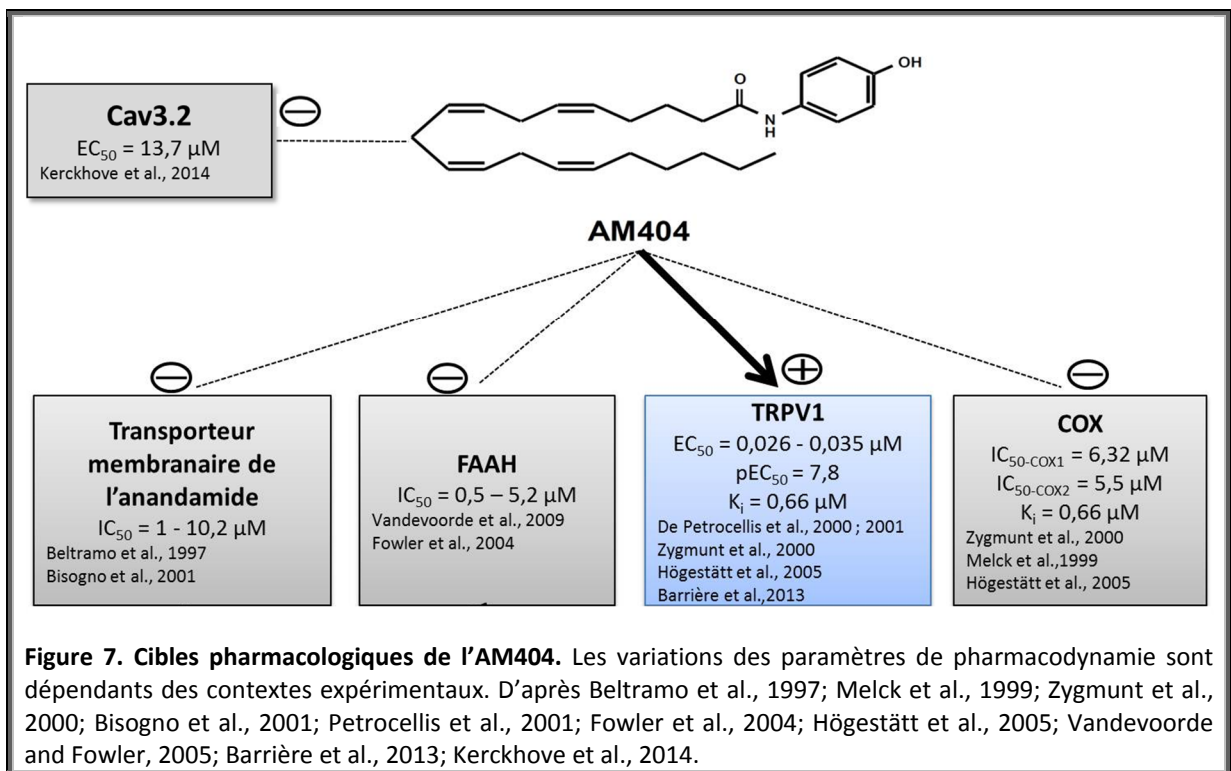


Figure 7. Cibles pharmacologiques de l'AM404. Les variations des paramètres de pharmacodynamie sont dépendants des contextes expérimentaux. D'après Beltramo et al., 1997; Melck et al., 1999; Zygmunt et al., 2000; Bisogno et al., 2001; Petrocellis et al., 2001; Fowler et al., 2004; Högestätt et al., 2005; Vandevorode and Fowler, 2005; Barrière et al., 2013; Kerckhove et al., 2014.

**MÉCANISME ANTALGIQUE DU PARACÉTAMOL : NOUVEAU CONCEPT D'UN
PROMÉDICAMENT À ACTION CENTRALE**

Tableau 3. Résumé des effets *in vivo* de l'AM404. Effets pharmacologiques observés après administration d'AM404. Voie intrapéritonéale (i.p.), voie intraveineuse (i.v.), voie intracérébroventriculaire (i.c.v.), injection intranucléaire dans la substance grise périaqueducule (intra-SGPA). Anandamide : AEA, rimonabant : agoniste inverse des récepteurs CB1, AM251 et SR141716A : antagonistes des récepteurs CB1, capsazépine : antagoniste des récepteurs TRPV1. D'après González et al., 1999; Beltramo and Piomelli, 2000; Giuffrida et al., 2001; Fegley et al., 2004; Fowler et al., 2005; Rawls et al., 2006; Mitchell et al., 2007; Moreira et al., 2007; Lisboa et al., 2008; Resstel et al., 2008; Mallet et al., 2010; Ayoub et al., 2011; Manna and Umathe, 2014.

Paramètres observés	AM404 : Doses,voies d'administrations et espèces animales utilisées	Effets observés
Nociception	10 mg/kg, i.v., souris	Pas d'effet sur le test de la plaque chaude 20, 30 et 60 minutes après administration. Potentialise et prolonge l'augmentation des seuils de latence produits par l'AEA (20 mg/kg, i.v.).
	10 mg/kg, i.p., rat	Effet anti-allodymique bloqué par l'AM251 dans le modèle de neuropathie. Aucun effet de l'AM404 sur le modèle de douleur inflammatoire.
	10 µg, i.c.v., rat	Pas d'effet antinociceptif observé seul sur le test de la plaque chaude.
	10 µg, i.c.v., souris	Effet antinociceptif observé sur les deux phases du test au formol et dépendant des récepteurs TRPV1.
	3 nmol, i.t., souris	Diminution de la douleur sur le test au formol comparable à l'AEA (3 nmol, i.t.). Pas d'additivité observée avec l'AEA.
Tension artérielle	10 mg/kg, i.v., cobayes	Effet modeste sur la tension artérielle. Potentialise la diminution de la tension artérielle de l'AEA (5 mg/kg, i.v.) chez les animaux vagotomisés.
Locomotion	10 mg/kg, i.p., rats	Augmentation des taux d'AEA dans le plasma. Augmentation de l'inactivité et de l'immobilité. Diminution de la locomotion. Effets bloqués par le rimonabant (0,5 mg/kg, i.p., agoniste inverse des récepteurs CB1). Troubles moteurs également inhibés par le SR141716A (0.5 mg/kg, i.p)
	10 mg/kg, i.p., rats	Diminution des comportements de déambulation chez un modèle de lésion à l'acide 3-nitropropionique ; effet bloqué par un antagoniste des récepteurs TRPV1 (capsazépine, 10 mg/kg, i.p.) mais non CB1 (rimonabant, 3 mg/kg, i.p.).
	1-5 mg/kg, i.p., rats	Réduction du déficit sensorimoteur obtenu après lésion nigrostriatal par la 6-hydroxydopamine.
	10 mg/kg, i.p., souris	Diminution des comportements stéréotypiques de sauts après un traitement répété de morphine.
Anxiété et dépression	50 nmol, intra-SGPA, rat	Diminution des comportements anxieux des animaux. Effet potentialisé par l'AEA et bloqué par un antagoniste des récepteurs CB1.
	10 et 20 mg/kg, i.p., souris	En association avec le paracétamol, l'AM404 potentialise la diminution des comportements de dépression aux tests de nage forcée, suspension par la queue et « <i>marble-burying</i> ».
Température corporelle	1- 20 mg/kg, i.p, rats	Effet hypothermisant dose dépendant. Effet dépendant des récepteurs TRPV1 et non des récepteurs CB1.
	10 mg/kg, i.p., souris FAAH ^{+/+}	Aucun effet sur la température corporelle. Cependant, associée à l'AEA (5 mg/kg, i.p.), un effet hypothermisant est noté
	10 mg/kg, i.p., souris FAAH ^{-/-}	Léger effet hypothermisant, potentialisé par l'AEA (2 mg/kg, i.p.). Hypothermie bloquée par le rimonabant (0,3 mg/kg, i.p.) mais pas par la capsazépine (30 mg/kg, i.p.).

a. L'AM404 : le premier inhibiteur du transporteur de l'anandamide

L'AM404 est un analogue structurel de l'AEA et agit comme un **inhibiteur compétitif du transporteur de l'AEA** sur des neurones ($CI_{50} = 1 \mu M$) et astrocytes ($CI_{50} = 5 \mu M$) en culture (Beltramo et al., 1997; Fowler and Jacobsson, 2002). Cependant, le transporteur membranaire de l'AEA en question n'est actuellement pas très bien caractérisé (Fowler, 2012; Ulugol, 2014). L'AM404 peut également inhiber l'activité de l'enzyme FAAH (Jarrahian et al., 2000), avec jusqu'à 55% d'inhibition observée pour la dose de 50 μM dans une préparation de cerveau total de rat. La FAAH est une enzyme notamment impliquée dans l'hydrolyse de l'AEA et dans une moindre mesure dans la dégradation du 2-arachidonylglycérol (2-AG, Lichtman et al., 2002). L'AM404 induit ainsi une augmentation des niveaux extracellulaires tant de l'AEA (Beltramo et al., 1997; Bortolato et al., 2006) que du 2-AG (Beltramo and Piomelli, 2000; Wiskerke et al., 2012). Une inhibition de l'accumulation de ^{14}C AEA et de 3H 2-AG sur des cellules de gliome de rat est observée avec respectivement une CI_{50} de 7,5 et 10,2 μM (Bisogno et al., 2001).

b. L'AM404 : un ligand des récepteurs TRPV1

Il a été montré que l'**application d'AM404 sur des segments isolés d'artères hépatiques de rat induit une vasodilatation inhibée par un antagoniste des récepteurs TRPV1**, la capsazépine (CPZ). Son effet sur les récepteurs TRPV1 est tout aussi efficace (AM404 : $pCE_{50} = 7,80 \pm 0,01$) que les agonistes de référence (capsaïcine : $pCE_{50} = 8,36 \pm 0,05$) (Högestätt et al., 2005). L'AM404 induit également un courant TRPV1 sur des ovocytes de *Xenopus* exprimant ce récepteur, comparable à d'autres agonistes (capsaïcine et AEA), qui est bloqué par l'antagoniste CPZ (Zygmunt et al., 2000). L'activité de l'AM404 sur ces récepteurs TRPV1 est discutable, car cet effet pourrait être indirect *via* l'inhibition du transporteur de l'AEA entraînant alors une augmentation des niveaux endogènes d'AEA et l'activation du récepteur vanilloïde TRPV1. Mais, les doses d'AM404 nécessaires à une vasodilatation sont largement inférieures aux doses requises pour inhiber le transporteur de l'AEA (Zygmunt et al., 2000).

c. L'AM404 : une action inhibitrice sur les COX1 / COX2

L'AM404 peut altérer la synthèse des prostaglandines. Son activité inhibitrice des COX ($CI_{50-COX1} = 6,32 \mu M$ et $CI_{50-COX2} = 5,5 \mu M$) lui permet de limiter la formation des prostaglandines E2 (PGE₂) (Högestätt et al., 2005). L'utilisation d'une culture de macrophages RAW264.7 montre qu'en présence de 0,1 et 1 μM d'AM404 la production de PGE₂ est diminuée (Högestätt et al., 2005).

d. L'AM404 : un modeste activateur des récepteurs CB1

L'utilisation d'un antagoniste sélectif des récepteurs CB1 ne modifie pas les effets vasodilatateurs de l'AM404 (Zygmunt et al., 2000). L'affinité de l'AM404 pour le récepteur CB1 est modérée avec un K_i de 1760 nM largement supérieur à celui de l'AEA ($K_i = 78$ nM, Zygmunt et al., 2000). Par contre, il y a un effet indirect de l'AM404 sur le système endocannabinoïdique *via* l'augmentation des taux endogènes des endocannabinoïdes (Giuffrida et al., 2000).

e. L'AM404 : une faible activité inhibitrice du canal Cav3.2

Les travaux menés dans l'article de Kerckhove et al. (2014) ont évalué par « *patch clamp* » que l'AM404 avait un faible potentiel effet inhibiteur des canaux Cav3.2 avec un $EC_{50} = 13.7$ μ M contrairement à l'antagoniste de référence TTA-A2 ($EC_{50} = 9.0$ nM). Cependant, l'AM404 aurait un effet plus prononcé en présence du récepteur TRPV1, laissant supposer une collaboration entre le récepteur TRPV1 et le canal Cav3.2 dans l'effet inhibiteur de l'AM404.

f. Propriétés antinociceptives de l'AM404

Les propriétés antinociceptives de l'AM404 sont très controversées. L'équipe de Piomelli n'observe aucun effet de l'AM404 qu'il soit administré par voie i.v. (10 mg.kg, Beltramo et al., 1997) ou au niveau cérébral (10 μ g en i.c.v., Beltramo et al., 2000). Mais, il peut **potentialiser et prolonger l'effet de l'AEA** en servant de substrat de substitution du transporteur de l'AEA (Beltramo et al., 1997, 2000). L'AM404 n'est pas complètement dénué d'effet sur la douleur. En contrepartie, plusieurs études montrent un **effet antinociceptif de l'AM404** voire un **effet antihyperalgique sur des modèles de douleur** (Costa et al., 2006; Hasanein, 2009; Mallet et al., 2010). Les travaux de Hasanein et al. (2009) et Mitchell et al. (2007) ont montré que pour des doses comprises entre 10 et 50 mg/kg, l'AM404 pouvait diminuer l'hyperalgie dans un modèle de neuropathie diabétique et de ligature du nerf sciatique. Ces effets antinociceptifs impliquent les récepteurs CB1 et TRPV1, car leur inhibition réduit les effets antihyperalgiques de l'AM404 (Costa et al., 2006).

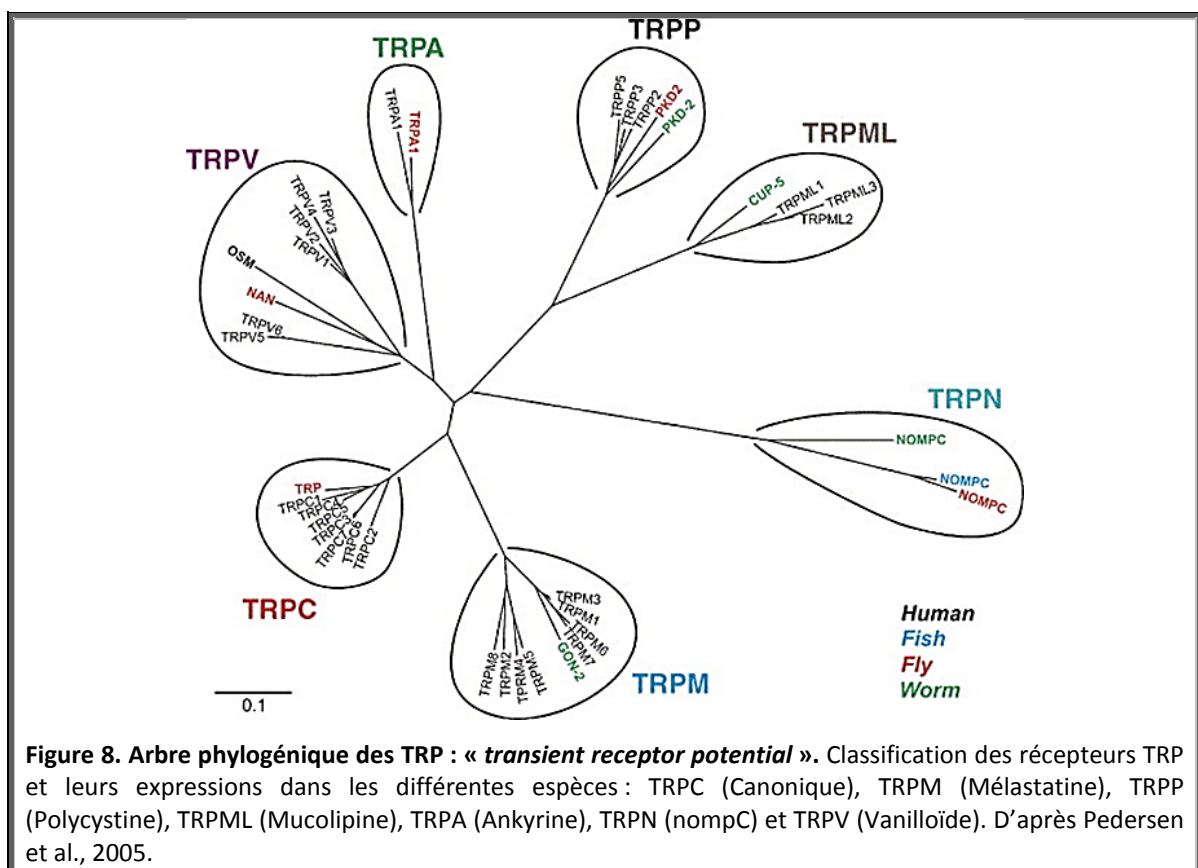
En résumé, l'AM404 interagit avec les cibles présentées dans la **Figure 7** pour induire ses divers effets pharmacologiques. Ces effets impliquent notamment **un potentiel antinociceptif en recrutant indirectement le système endocannabinoïdique ou en agissant sur les récepteurs TRPV1.**

III. Mécanisme central : systèmes de neurotransmission impliqués dans l'effet du paracétamol

1. Paracétamol et récepteur vanilloïde 1

a. Les récepteurs vanilloïdes : généralités

Le système endovanilloïde comprend une famille de récepteurs appelée « *Transient Receptor Potential* » (TRP) constituée de canaux perméables aux ions. Chez les mammifères, 28 gènes sont comptabilisés codant pour des sous-unités des récepteurs TRP. La Superfamille des TRP a été classée en 7 sous-groupes, dont 6 sont retrouvés chez les mammifères (**Figure 8**).



La particularité des récepteurs TRP est qu'ils possèdent une structure commune. Ils sont composés de 838 acides aminés formant 6 domaines transmembranaires rassemblés en homo- ou hétérotétramères, dont un domaine hydrophobe entre les domaines 5 et 6 pour la formation du canal. Les extrémités N- et C- terminales sont intracellulaires (**Figure 9**). Ces canaux sont généralement perméables aux cations mono- ou divalents et plus particulièrement au Ca^{2+} , modulant ainsi l'entrée d'ions Ca^{2+} intracellulaire (Pedersen et al., 2005). En modulant les taux cytosoliques de Ca^{2+} , les récepteurs TRP jouent un rôle fondamental dans les processeurs de signalisation cellulaire avec une prédominance dans les fonctions du système nerveux et dans la physiologie sensorielle. En

effet, l'entrée de Ca^{2+} induit divers effets tels que la contraction musculaire, la prolifération cellulaire, la sécrétion de neurotransmetteurs, l'activation de diverses voies intracellulaires et la transmission des influx nerveux, tels que les messages nociceptifs (Berridge et al., 2000).

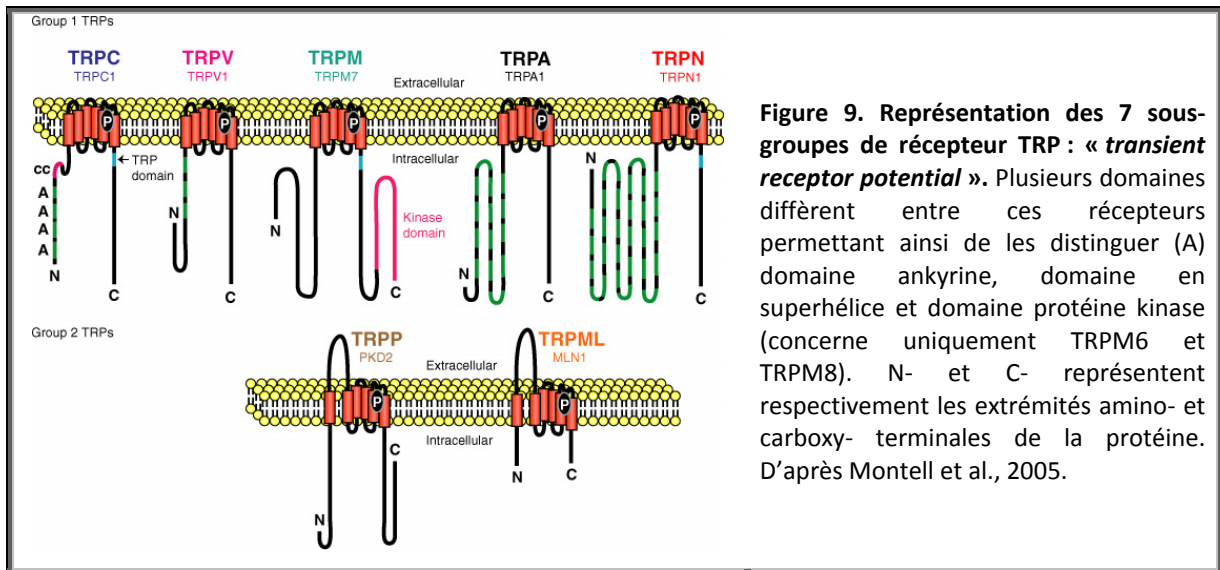


Figure 9. Représentation des 7 sous-groupes de récepteur TRP : « transient receptor potential ». Plusieurs domaines diffèrent entre ces récepteurs permettant ainsi de les distinguer (A) domaine ankyrine, domaine en superhélice et domaine protéine kinase (concerne uniquement TRPM6 et TRPM8). N- et C- représentent respectivement les extrémités amino- et carboxy- terminales de la protéine. D'après Montell et al., 2005.

Parmi ces sous-groupes de récepteurs, **les TRPV** (« *Transient Receptor Potential Vanilloid* ») se distinguent des autres car ce sont les plus étudiés et les premiers découverts, en particulier **le récepteur vanilloïde de type 1 (TRPV1)**. Ce sous-groupe fait partie des canaux dits thermosensibles. Il participe entre autres aux fonctions physiologiques sensorielles dans la détection des températures chaudes non nociceptives à nociceptives (Montell et al., 2005; Pedersen et al., 2005, **Figure 10**). Cette sous-classe est subdivisée en 6 types de récepteurs dont les fonctions et les localisations sont présentées dans la **Tableau 4**.

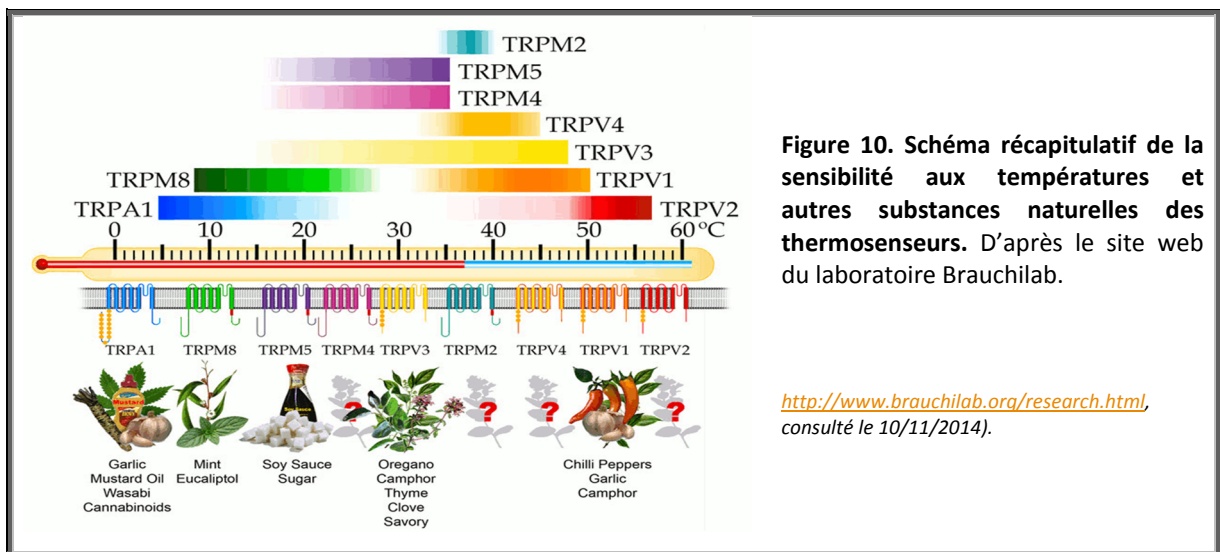


Figure 10. Schéma récapitulatif de la sensibilité aux températures et autres substances naturelles des thermosenseurs. D'après le site web du laboratoire Brauchilab.

<http://www.brauchilab.org/research.html>, consulté le 10/11/2014).

L'ensemble de ces récepteurs permet de rendre compte du panel de températures auxquelles nous pouvons être confrontés, qu'elles soient nociceptives ou non. En effet, sur une gamme de température radiante qui augmente à proximité de la peau, une sensation de douleur apparaît à partir de 43°C (Dhaka et al., 2006). Cette douleur est initiée par des thermosenseurs situés sur les fibres nociceptives A δ et C, sensibles aux températures nociceptives (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998). D'ailleurs, le premier récepteur découvert de la sous-classe des TRPV responsable de la détection des températures chaudes nociceptives est le récepteur TRPV1. Il fut cloné par David Julius et son équipe en 1997. Il a été montré que ce récepteur est non seulement à l'origine de la détection de la chaleur nociceptive, mais peut aussi être activé par un ensemble de facteurs comme les protons (à pH acide) ou certains agents retrouvés dans la « soupe » inflammatoire (Tominaga et Caterina, 2004; Holzer, 2011). Sa découverte repose principalement sur l'utilisation de son ligand naturel exogène le plus connu : la capsaïcine. Ce composé vanilloïde, principe actif des poivres de la famille *capsicum*, est entre autres retrouvé dans les piments ce qui leur confère le goût piquant utilisé pour relever certains plats (Heyman et Rang, 1985). *In vivo*, la capsaïcine produit une sensation de chaleur et de douleur qui n'est pas retrouvée chez les souris dont le gène pour le récepteur TRPV1 est délété (souris TRPV1^{-/-}, Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000). L'effet nociceptif de la capsaïcine est dû à l'activation des récepteurs TRPV1 exprimés sur des nocicepteurs périphériques. L'activation du récepteur perméable aux ions Ca²⁺ entraîne un accroissement en Ca²⁺ cytosolique et déclenche un potentiel d'action nociceptif (Dray et al., 1990).

Tableau 4. Fonctions physiologiques, modes d'activation et localisations des récepteurs TRPV1 à TRPV6.
D'après Montell, 2005; Pedersen et al., 2005; Dhaka et al., 2006.

Nom	Fonctions physiologiques	Mode d'activation	Localisation
TRPV1	Senseur des températures chaudes nociceptives (>43°C) Sensible au pH Sensible aux composés de la famille des capsicums	Chaleur (>43°C), vanilloïdes (capsaïcine), anandamide, protons, PIP ₂ , résinifératoxine, allïcine, camphre et exocytose	Ganglions rachidiens, trijumeau, moelle épinière, cerveau, système nerveux périphérique, peau, langue, et vessie
TRPV2	Senseur des températures chaudes nociceptives (>52°C)	Chaleur (>52°C), exocytose et les déformations membranaires	Ganglions rachidiens, moelle épinière, cerveau, petit et gros intestin, myocytes et cellules vasculaires
TRPV3	Senseur des températures chaudes non nociceptives (30-39°C)	Températures modérées (30-39°C) et camphre	Ganglions rachidiens, trijumeau, moelle épinière, cerveau, kératinocytes et langue
TRPV4	Senseur osmotique Senseur des températures chaudes modérées non nociceptives (>27°C)	Gonflement cellulaire dû à la pression osmotique, ester de phorbol, températures modérées (27°C)	Reins, poumons, rate, testicules, endothélium, foie, cœur, ganglions rachidiens, cerveau et kératinocytes
TRPV5	Réabsorption du Ca ²⁺ au niveau des reins	Faible concentration en Ca ²⁺ intracellulaire, hyperpolarisation et exocytoses	Reins, duodénum, jéjunum, placenta et pancréas
TRPV6	Réabsorption du Ca ²⁺	Idem TRPV5	Petit intestin, pancréas, placenta et prostate (seulement lors de lésion précancéreuses)

La distribution de ce récepteur est assez large (**Tableau 4**) et il est retrouvé aussi bien sur les extrémités des neurones sensitifs périphériques de petit diamètre qu'au niveau central. L'activation de ce récepteur est dépendante de protagonistes extérieurs comme la température, le pH ou des ligands décrits dans la **Tableau 4**. En condition physiologique, il est inactif. Par contre, son seuil d'activation peut être modulé en condition pathologique (**Figure 11**). Lors d'une inflammation, plusieurs agents de la « soupe inflammatoire » sont à même de sensibiliser ce récepteur abaissant ainsi son seuil d'activation, et le rendant plus facilement activable voire activé (Szallasi et al., 2007). Il y a également une augmentation de l'expression du récepteur TRPV1 au niveau des ganglions de la racine dorsale (« *dorsal root ganglion* » ou DRG) lors d'une inflammation chronique (Yu et al., 2008). Par exemple, sur un modèle d'inflammation induite par une administration intraplantaire (i.pl.) d'adjuvant complet de Freund (ACF), une augmentation de l'expression du récepteur TRPV1 est induite par certains composés de la « soupe inflammatoire » et l'acidose tissulaire qui en résulte (Palazzo et al., 2012b). La régulation de ce récepteur peut avoir lieu également au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel (Szallasi et al., 2007). L'expression des récepteurs TRPV1 périphériques est augmentée dans différentes pathologies telles que le syndrome du côlon irritable

(Yiangou et al., 2001) ou dans un modèle de neuropathie comme la ligature du nerf sciatique (Rashid et al., 2003). Une augmentation de l'expression des récepteurs TRPV1 est observée également dans les DRG chez le rat neuropathique diabétique (Hong et Wiley, 2005; Pabbidi et al., 2008). Inversement, au niveau supra-spinal, une diminution de l'expression des récepteurs TRPV1 peut être observée dans ce même modèle de neuropathie (Mohammadi-Farani et al., 2010).

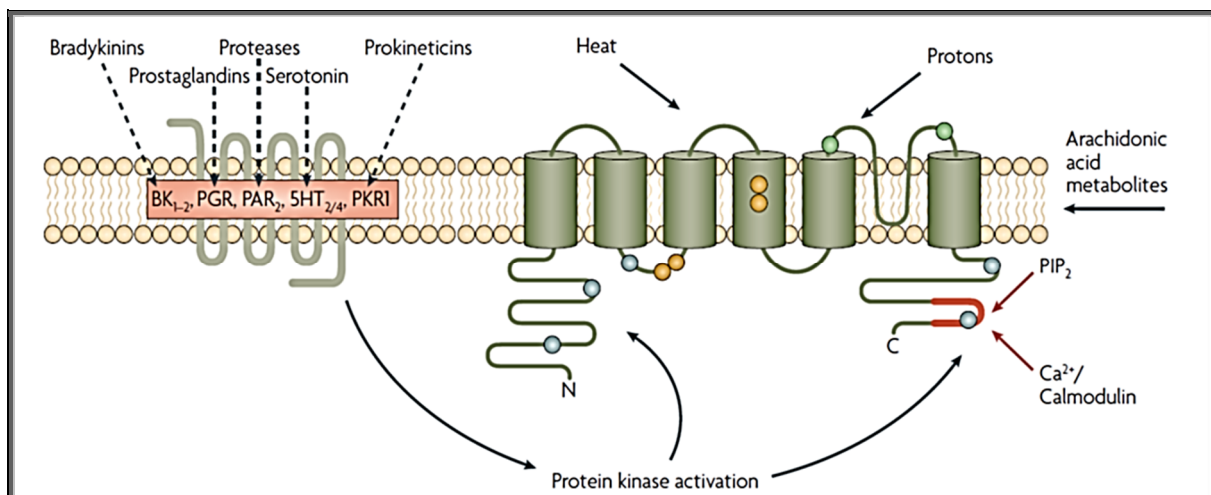


Figure 11. Schéma structurel du récepteur TRPV1 et modulation de son activité en condition inflammatoire. Le récepteur TRPV1 est sensibilisé par certains agents de la soupe inflammatoire comme les prostaglandines (PG), les bradykinines (BK) et les facteurs de croissance neuronaux (NGF). Ces agents activent un second messager : les protéines kinases C ou A, qui phosphorylent les extrémités N- et C-terminales du récepteur, induisant un changement tridimensionnel et facilitant son ouverture. D'autres sites de régulation de l'activité du récepteur font intervenir la Calmoduline. D'après Szallasi et al., 2007.

b. Rôles physiologiques des récepteurs TRPV1

Le récepteur TRPV1 est sans doute l'un des récepteurs les plus étudiés. Sa vaste distribution dans les tissus lui confère de nombreuses propriétés physiologiques. Ce récepteur joue un rôle crucial dans la perception des températures et dans la nociception (Caterina et al., 2000). Le **Tableau 5** résume les rôles de ce récepteur en fonction de son expression au sein des différents systèmes de l'organisme.

**MÉCANISME ANTALGIQUE DU PARACÉTAMOL : NOUVEAU CONCEPT D'UN
PROMÉDICAMENT À ACTION CENTRALE**

Tableau 5. Rôle des récepteurs TRPV1 dans différents systèmes biologiques.

Système	Localisation	Rôle	Références
Digestif	Nerf sensoriel de la muqueuse gastrointestinale		Ward et al., 2003
	Plexus myentérique (antre, fundus, jéjunum, iléon et le long du colon)	Maintien de l'intégrité contre les agressions externes	Peng et Li, 2010
	Muqueuse des couches musculaires et des vaisseaux sanguins	Senseur d'acidité	Holzer et al., 2004
	Cellules gastriques épithéliales	Modulation de la sécrétion de gastrine Vasodilatation et sécrétion de mucus	Ericson et al., 2009 Akiba et al., 1999 Holzer et al., 2007
Cardio-vasculaire	Myocarde	Cardioprotecteur (infarctus du myocarde)	Peng et Li, 2010
	Vaisseaux coronaires	Régulation de la pression artérielle (vasodilatation ou vasoconstriction)	Robbins et al., 2013 Sexton et al., 2007
		Perception douloureuse en prévention d'une ischémie cardiaque	Scotland et al., 2004 Zygmunt et al., 1999
Urinaire	Fibres sensorielles entourant la vessie		Birder et al., 2001
	Urothélium	Senseur d'acidité (détection de la présence d'agent irritant)	Ost et al., 2002 Yiangou et al., 2002
	Detrusor (couche de muscles lisses située au niveau de la paroi de la vessie)	Mécanosenseur (détection de distension de la vessie)	Tominaga et al., 1998 Birder et al., 2001
	Fibroblastes		Daly et al., 2007
Respiratoire	Muqueuse nasale		
	Épithélium de la trachée	Senseur thermique	
	Parenchyme pulmonaire	Senseur d'acidité	Watanabe et al., 2006
	Alvéoles	Bronchoconstricteur	Banner et al., 2011
	Muscles lisses	Modulation de la sécrétion de mucus	Takemura et al., 2008
	Vaisseaux pulmonaires	Réflexe de la toux	
Thermosensation Thermorégulation	Couches de l'épiderme et du derme (Kératinocytes)	Thermosensation et régulation de l'homéostasie thermique	Caterina et al., 2003 Southall et al., 2003
	Fibres sensorielles périphériques	Rôle dans les processus inflammatoires	Gavva et al., 2007
	Endothélium des vaisseaux sanguins	Vasodilatation	Holzer et al., 2011
	papilles gustatives de la langue	Perception gustative (sensation de goût piquant, brûlant et amer aversif)	Karlsson et al., 2005 Romanovsky et al., 2009
	Aire pré-optique antérieure		Dhaka et al., 2006

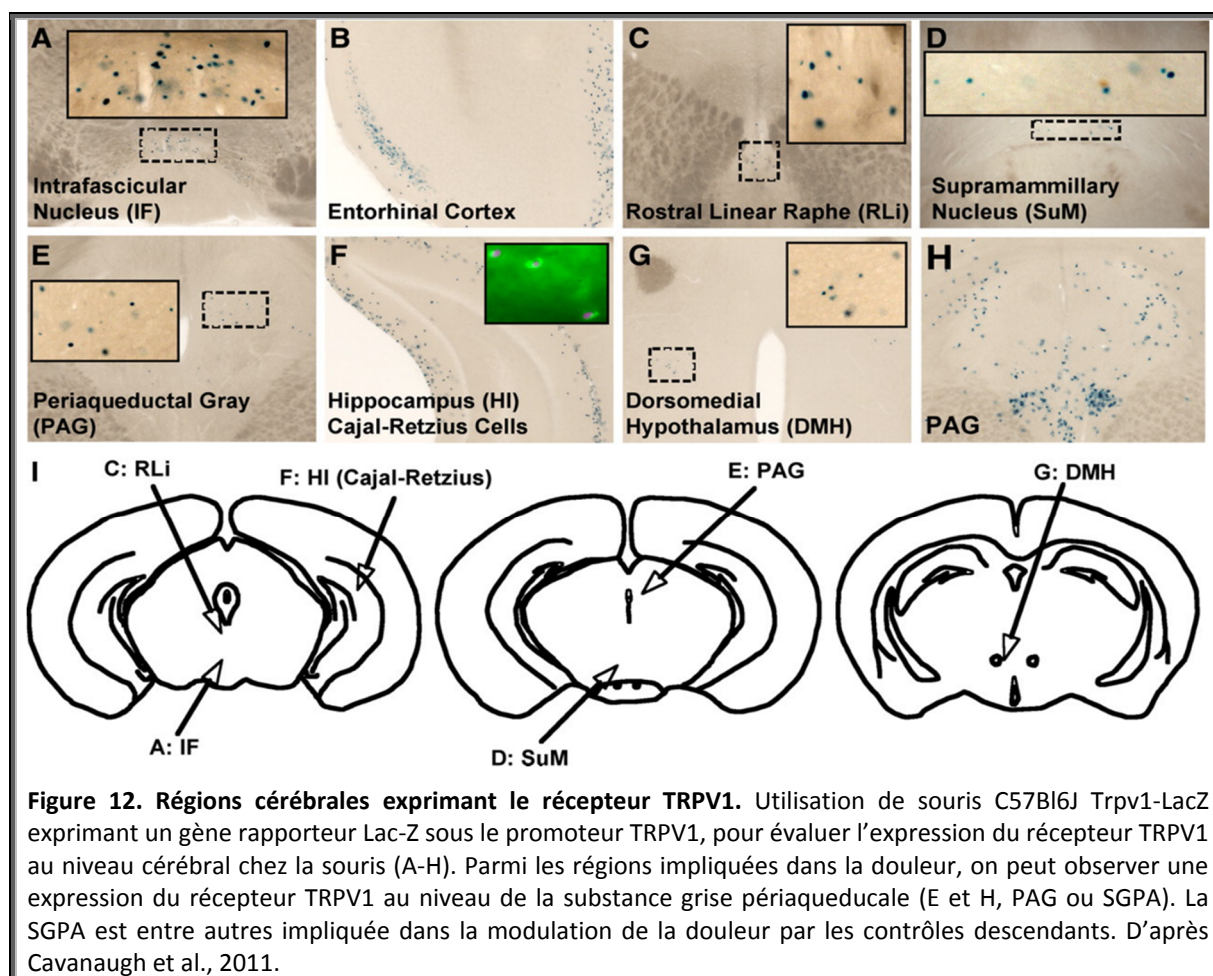
Les récepteurs TRPV1 contribuent largement à la physiologie de la douleur. Ils participent notamment à la thermosensation des températures nociceptives, mais interviennent aussi dans la sensibilisation douloureuse lors d'un état inflammatoire. Les récepteurs TRPV1 sont retrouvés aussi bien en périphérie au niveau des extrémités des fibres sensorielles de petits calibres de type C et A δ , qu'au niveau médullaire et cérébral (Szallasi et al., 2007). Leurs rôles dans la nociception dépendent de leurs localisations.

Au niveau périphérique, ce récepteur est sensible à des *stimuli* nociceptifs (chaleur, proton, capsaïcine et autres dérivés de l'acide arachidonique...). Son activation induit un potentiel d'action au niveau des fibres afférentes primaires nociceptives qui conduisent le message jusqu'aux centres supérieurs pour y être interprété comme un *stimulus* pronociceptif. Le récepteur TRPV1 est aussi impliqué dans d'autres processus nociceptifs, car il est également considéré comme un intégrateur de la douleur inflammatoire. L'administration intradermique d'une solution de capsaïcine de 10 μ mol chez le rat ou de 100 μ g chez l'homme est suffisante pour activer les nocicepteurs polymodaux et induire un comportement douloureux (Hohmann et al., 2004; Scanlon et al., 2006). Le récepteur TRPV1 joue un rôle dans la sensibilité à la douleur (hyperalgie) générée par une inflammation. Son expression est positivement régulée en conditions inflammatoires, et son activité est sensibilisée par certains médiateurs de l'inflammation, comme une légère acidification, la bradykinine, l'ATP (adénosine triphosphate) ou bien le facteur NGF (« *Nerve Grow Factor* », Dhaka et al., 2006; Story et al., 2006). Comme la plupart des canaux TRP, le récepteur TRPV1 se désensibilise lors de contacts répétés avec l'agent stimulant. Ainsi, l'administration périphérique de capsaïcine, agoniste des récepteurs TRPV1, induit une douleur intense immédiate suivie d'un effet antalgique, qui s'explique par ce phénomène de désensibilisation des fibres nociceptives primaires. Cela a abouti à la mise au point d'une forme de capsaïcine topique à une concentration de 8% avec la spécialité pharmaceutique Qutenza[®] qui possède une autorisation de mise sur le marché dans le traitement des douleurs neuropathiques périphériques autres que diabétiques (Szallasi et Blumberg, 1999; Knotkova et al., 2008).

Au niveau médullaire, le récepteur est exprimé tout d'abord au niveau des DRG où son expression se voit augmentée lors d'un processus inflammatoire (Story et al., 2006). Il est également retrouvé au niveau des couches superficielles (couches I et II) de la corne dorsale de la moelle épinière (Story et al., 2006). Le sujet de mes travaux de thèse se focalise sur les aspects supra-spinaux du mécanisme d'action antalgique du paracétamol, nous développerons donc le rôle supra-spinal de ces récepteurs TRPV1.

La distribution des récepteurs TRPV1 au niveau supra-spinal a été mise en évidence par diverses techniques. L'utilisation de techniques comme le suivi de radioligands TRPV1, le marquage

immunohistochimique, l'hybridation *in situ* et la RT-PCR ont permis de montrer la présence plus ou moins discrète de ces récepteurs dans certaines régions cérébrales et dans le trijumeau (Mezey et al., 2000; Roberts et al., 2004; Tóth et al., 2005; Cristino et al., 2006). Cependant, la présence d'un récepteur fonctionnel et sa localisation précise demeurent assez floues avec des données contradictoires en fonction des articles de la littérature (Menigoz et Boudes, 2011). La génération d'une souche de souris C57Bl6J Trpv1-LacZ par l'équipe de Cavanaugh et al. (2011) a clarifié la localisation des récepteurs TRPV1 dans les différents noyaux cérébraux. La construction génétique des souris C57Bl6J Trpv1-LacZ montre l'intégration d'un gène LacZ codant pour une enzyme la β -galactosidase en aval du gène codant pour le récepteur TRPV1. Cette stratégie a permis de montrer que le récepteur TRPV1 est retrouvé, de manière discrète, au niveau de l'encéphale. Son expression est plus abondante au niveau du noyau intrafasciculaire, du cortex entorhinal, dans le raphé rostralinéraire, dans la substance grise périaqueducale (SGPA) ainsi que dans le noyau dorsomédian de l'hypothalamus. En outre, le récepteur TRPV1 est exprimé dans les neurones non pyramidaux de l'hippocampe (Figure 12).

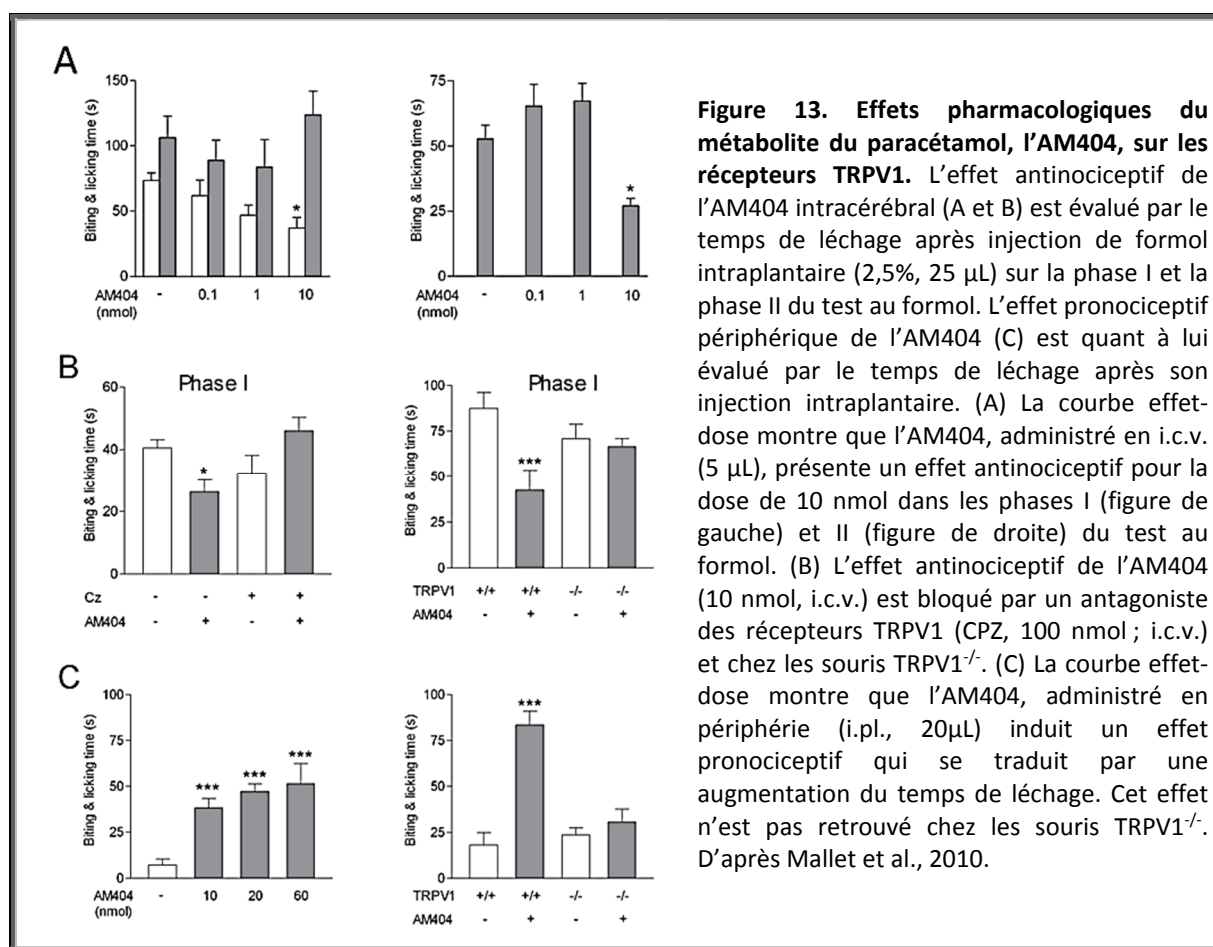


Jusqu'à présent, l'activation des récepteurs TRPV1 périphériques était synonyme de douleur avec une implication plutôt pronociceptive. Cependant, des études *in vivo* montrent que

l'administration supra-spinale d'un agoniste TRPV1 a un effet antinociceptif. Déjà en 1982, Bodnar et al. montrèrent que l'administration directe de capsaïcine par voie i.c.v. pouvait augmenter les seuils de douleur chez les rats (Bodnar et al., 1982). Plus récemment, il a été prouvé que l'activation des récepteurs TRPV1 présents dans une région clé des contrôles descendants (la SGPA) pouvait produire un effet antinociceptif (Starowicz et al., 2007; Liao et al., 2011). Sachant que le métabolite du paracétamol (AM404) formé principalement au niveau cérébral peut interagir avec ces récepteurs TRPV1, et que des données récentes ont déjà fait état du potentiel effet antinociceptif de l'AM404 administré par la voie i.c.v. (Kerckhove et al., 2014), il était intéressant de s'interroger sur le rôle du récepteur TRPV1 cérébral dans le mécanisme d'action antalgique du paracétamol.

c. Implication des récepteurs TRPV1 dans le mécanisme d'action antalgique du paracétamol

L'idée de l'implication potentielle des récepteurs TRPV1 dans le mécanisme d'action antalgique du paracétamol est issue de l'article d'Högestätt et al. (2005). Les travaux menés sur la découverte d'un nouveau métabolite du paracétamol, l'AM404, a permis d'avancer l'hypothèse que ce dernier pourrait être le métabolite responsable de l'effet antinociceptif du paracétamol. Les travaux de Zygmunt et al., (2000) avaient montré au préalable que l'AM404 était non seulement un inhibiteur du transporteur membranaire de l'anandamide (AMT pour « *Anandamide Membrane Transporter* »), mais aussi un agoniste des récepteurs TRPV1. Ainsi, il était intéressant de savoir si l'AM404 pouvait partager les caractéristiques des activateurs TRPV1 (effet pronociceptif en périphérie et antinociceptif en cérébral). En effet, l'administration périphérique d'AM404 par injection i.pl. (10-60 nmol, i.pl.) chez la souris s'avère douloureuse (**Figure 13C, gauche**). Ce phénomène est TRPV1 dépendant car ce comportement n'est pas retrouvé chez les souris TRPV1^{-/-} (**Figure 13C, droite**). Inversement, une administration de 10 nmol d'AM404 au niveau cérébral (i.c.v.) réduit les symptômes douloureux induit par une injection i.pl. de formol, aussi bien sur la première phase de douleur dite aiguë, ou phase I, que sur la deuxième phase de douleur dite inflammatoire, ou phase II (Mallet et al., 2010; Kerckhove et al., 2014). Ces mêmes effets antinociceptifs ne sont ni retrouvés chez les souris TRPV1^{-/-} (**Figure 13B, gauche**) ni observés après utilisation d'un antagoniste des récepteurs TRPV1 (**Figure 13B, droite**). L'effet antinociceptif de l'AM404 administré au niveau cérébral est d'autant plus intéressant que l'étude d'Högestätt et al. (2005) a montré la formation d'AM404 majoritairement au niveau cérébral suite à l'administration de paracétamol systémique (300 mg/kg, i.p., Cf. **2^{ème} chap.II. Voies métaboliques du paracétamol : le paracétamol, un promédicament**).



Ces résultats apportent une théorie séduisante d'un médicament administré par voie systémique avec un effet ciblé au niveau cérébral. Mais aucune donnée ne justifiait que l'effet antinociceptif du paracétamol implique les récepteurs TRPV1 supra-spinaux. Les résultats obtenus par notre laboratoire (Mallet et al., 2010) apportent des preuves quant à l'implication des récepteurs TRPV1 supra-spinaux dans l'effet antinociceptif du paracétamol.

En effet, l'administration de paracétamol par voie systémique (200 mg/kg, *p.o.*) n'a aucun effet antinociceptif lors d'une délétion génétique (souris TRPV1^{-/-}, **Figure 14A, gauche**) ou une inhibition pharmacologique des récepteurs TRPV1 (CPZ, 10 mg/kg, voie i.p., **Figure 14A, droite**). De plus, l'effet antinociceptif d'une administration systémique de paracétamol (200 mg/kg, *p.o.*) est bloqué par l'injection cérébrale d'un antagoniste des récepteurs TRPV1 sur le test au formol (CPZ, 100 nmol, voie i.c.v., **Figure 14B**).

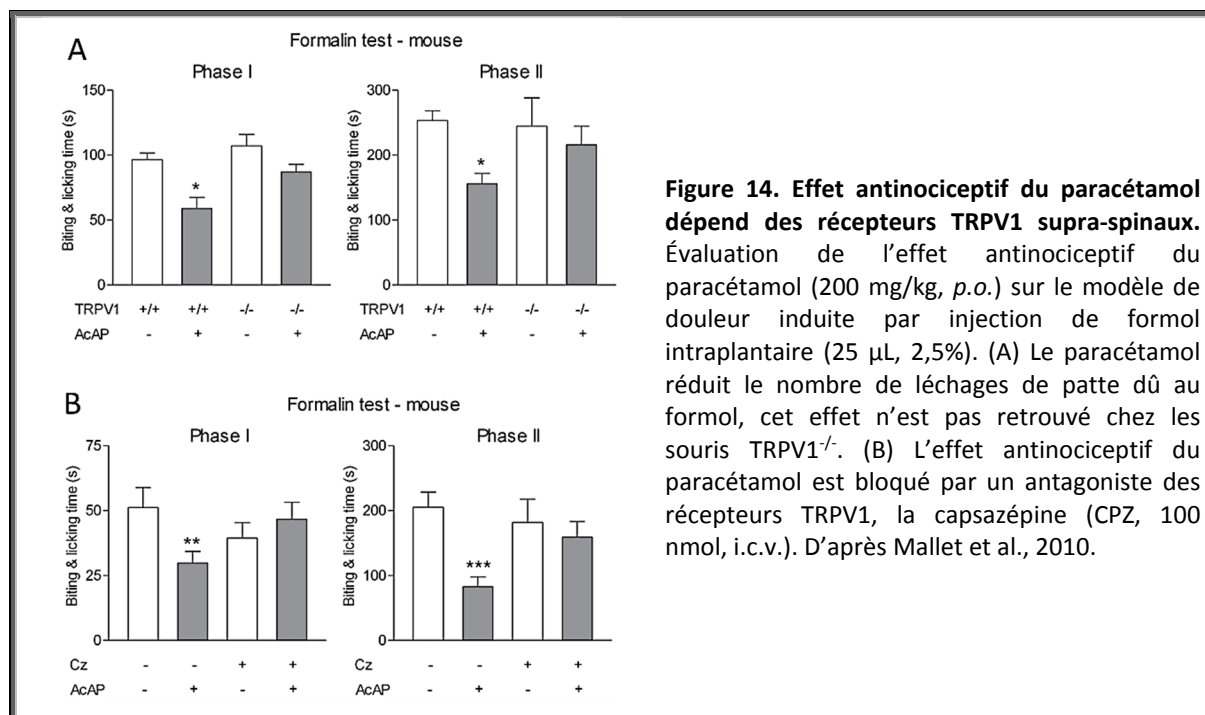


Figure 14. Effet antinociceptif du paracétamol dépend des récepteurs TRPV1 supra-spinaux. Évaluation de l'effet antinociceptif du paracétamol (200 mg/kg, p.o.) sur le modèle de douleur induite par injection de formol intraplantaire (25 µL, 2,5%). (A) Le paracétamol réduit le nombre de léchages de patte dû au formol, cet effet n'est pas retrouvé chez les souris TRPV1^{-/-}. (B) L'effet antinociceptif du paracétamol est bloqué par un antagoniste des récepteurs TRPV1, la capsazépine (CPZ, 100 nmol, i.c.v.). D'après Mallet et al., 2010.

Les propriétés pharmacologiques de l'AM404 ne se limitent pas à un effet activateur des récepteurs TRPV1. Il est en partie connu pour être un inhibiteur de la recapture de l'AEA, un endocannabinoïde pouvant être impliqué dans la modulation de la douleur *via* le système endocannabinoïdérique. Il a par ailleurs été montré qu'un blocage pharmacologique à l'aide d'antagonistes ou une délétion génétique des récepteurs CB1 pouvait bloquer l'effet antalgique du paracétamol (Mallet et al., 2008). Le système endocannabinoïdérique, et plus particulièrement le récepteur CB1, sera développé ci-dessous.

2. Paracétamol et récepteur cannabinoïde 1

a. Les récepteurs cannabinoïdes : généralités

La notion de récepteurs aux cannabinoïdes nous amène à l'utilisation du cannabis. Le cannabis est l'une des plus anciennes plantes (chanvre ou *Cannabis sativa*) utilisées pour ses vertus thérapeutiques et récréatives. Ses origines remontent à plus de 2000 avant J.-C., dont le berceau de culture s'étend des steppes d'Asie centrale jusqu'en Chine. À l'époque, L'empereur *Shen Nung Ben* découvrit les vertus de cette plante. Le cannabis est alors repris dans la pharmacopée de « *Shen nung pen ts'ao ching* » sous le nom traduit de « grande herbe » dans le traitement des rhumatismes, mais aussi dans le traitement du paludisme, des infections gynécologiques et dans la constipation. Associé au vin, il montre des vertus anesthésiques et analgésiques (Lambert, 2002). Durant l'Égypte ancienne, des traces du principe actif du cannabis, le **Δ -9-tétrahydrocannabinol (Δ 9-THC)**, furent retrouvées sur des corps momifiés. Certains papyrus mentionnaient déjà l'utilisation du cannabis

comme pansement antidépresseur et antidouleur. Plusieurs autres anecdotes historiques font d'ailleurs état de cette plante et de ses vertus thérapeutiques. En 1839, O'Shaughnessy, un médecin et chirurgien britannique découvre ses propriétés analgésiques, antiémétiques, anticonvulsivantes et myorelaxantes (Russo, 2013). Ses observations, publiées en 1842, conduisent rapidement à l'expansion de l'usage médical de la substance. En 1854, le cannabis est inclus dans les dispensaires aux États-Unis. Jusque dans les années 1930-1940, il sera vendu librement dans les pharmacies et sera présent dans de nombreuses pharmacopées, après quoi il en sera progressivement retiré en raison de ses effets psychoactifs. En réalité, le cannabis contient plus de 460 produits connus, dont plus de 60 cannabinoïdes. L'ingrédient psychoactif majeur de la marijuana et du haschich est le $\Delta 9$ -THC. De nos jours, l'usage du cannabis est principalement récréatif. Toutefois, aux États-Unis et au Canada, deux préparations pharmaceutiques utilisant le $\Delta 9$ -THC, le Marinol[®] et le Césamet[®] sont prescrites pour le contrôle des nausées et des vomissements engendrés par la chimiothérapie et pour la stimulation de l'appétit chez les patients atteints du SIDA. En juin 2005, un spray oral, le Sativex[®], dont les principes actifs sont le $\Delta 9$ -THC et le cannabidiol, a reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) au Canada dans le traitement des douleurs neuropathiques résistantes chez l'adulte atteint de sclérose en plaques. En France, une AMM pour le Sativex[®] a d'ailleurs été acceptée en janvier 2014 pour le traitement des douleurs neuropathiques, mais limitée à certains patients atteints de sclérose en plaques.

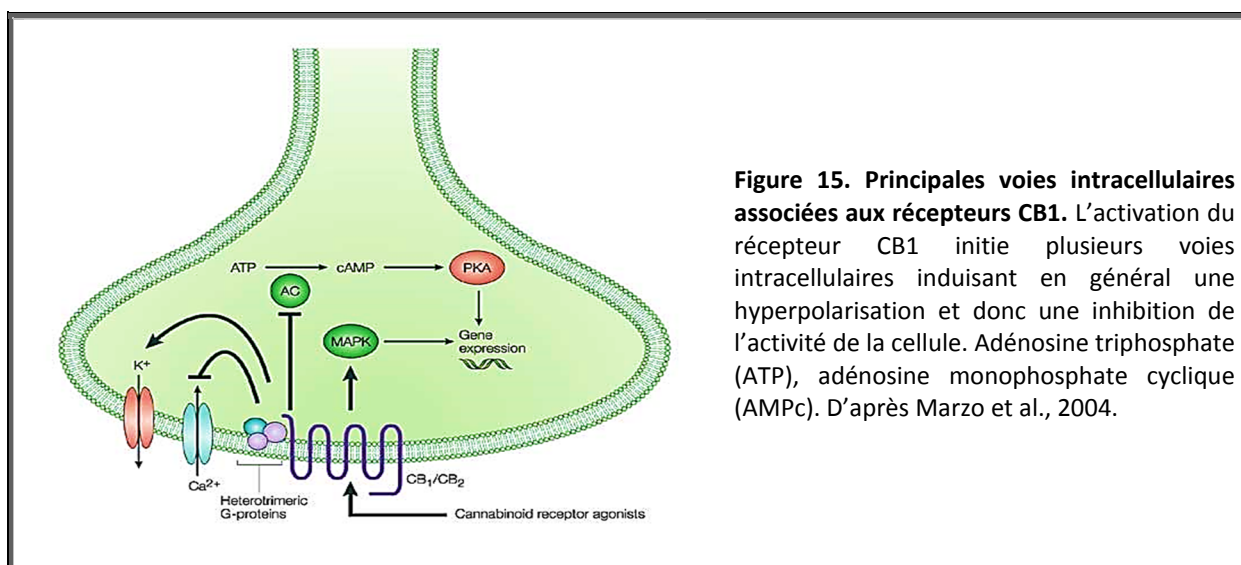
L'existence d'un récepteur membranaire CB1, cible du $\Delta 9$ -THC, est mis en avant par l'équipe de Devane et al. (1988) puis cloné en 1990 (Matsuda et al., 1990), rapidement suivi par la découverte de son homologue CB2 (Munro et al., 1993). La caractérisation de leurs ligands endogènes a montré que ces récepteurs CB1 et CB2 ne lient pas seulement à des molécules exogènes, telles que le $\Delta 9$ -THC, mais il existe tout un système endogène complexe ciblant ces récepteurs. Ces découvertes ont suscité l'intérêt pour comprendre le rôle physiologique de ce système endocannabinoïdérique (Devane et al., 1992).

Au vu de l'implication des récepteurs CB1 dans le mécanisme d'action antalgique du paracétamol, nous détaillerons simplement les données concernant le récepteur CB1.

b. Le récepteur CB1

Le récepteur CB1 est composé de 472 acides aminés chez l'homme (Gérard et al., 1991). Il est constitué de sept domaines transmembranaires couplés à une protéine $G_{i/o}$ connue pour inhiber l'activité de l'adénylate cyclase. L'activation de ce récepteur va moduler l'activité de plusieurs types de canaux ioniques afin de favoriser l'entrée de potassium dans la cellule conduisant à une hyperpolarisation membranaire. Ainsi, **l'activation du récepteur CB1 conduit à une diminution de**

l'excitabilité cellulaire. Les récepteurs CB1 sont localisés majoritairement au niveau **pré-synaptique de fibres GABAergiques** et exprimés à un plus faible niveau dans les terminaisons glutaminergiques (Freund et al., 2003; Mackie, 2005; Kawahara et al., 2011; Wilson-Poe et al., 2014). Il aurait un rôle de modulation des systèmes excitateurs (ex : fibres glutamatergiques) ou inhibiteurs (ex : fibres GABAergique) *via* un rétrocontrôle négatif (Marzo et al., 2004; Kano et al., 2009). Il est souvent décrit que le récepteur CB1 intervient dans la diminution de la libération de GABA par les interneurons GABAergiques, contribuant alors indirectement à une activation cellulaire de fibres excitatrices telle que les neurones glutamatergiques (Pistis et al., 2002).



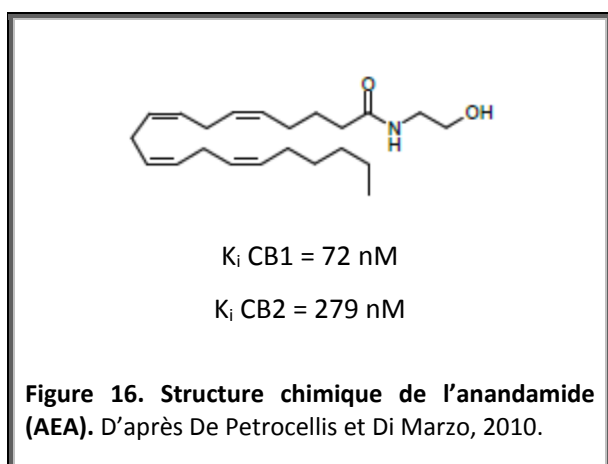
Le récepteur CB1 est majoritairement retrouvé au niveau cérébral et médullaire. Il est un des récepteurs les plus abondamment exprimés au niveau du système nerveux central. Au niveau cérébral, il est localisé notamment au niveau des terminaisons pré-synaptiques des cortex (somatosensoriels, préfrontaux, cingulaires et moteurs) et de certains noyaux de la base comme le thalamus, l'hippocampe, l'amygdale, la SGPA et le cervelet (Mackie, 2005). Au niveau médullaire, le récepteur CB1 est retrouvé au niveau de la substance gélatineuse (*Laminae* II), au niveau de la corne ventrale, mais aussi sur les terminaisons des afférences primaires et dans les DRG (Herkenham et al., 1991; Chin et al., 2008; Kano et al., 2009). Ces récepteurs CB1 sont exprimés aussi bien sur les fibres nociceptives que sur les fibres non nociceptives (Agarwal et al., 2007). Longtemps considéré comme exclusivement représenté au niveau du système nerveux central, le récepteur CB1 est malgré tout retrouvé au niveau de plusieurs tissus périphériques principalement associés au système nerveux périphérique (Pertwee, 1997, 1999). L'importance de la distribution de ces récepteurs et les nombreux effets relatés par l'utilisation d'agonistes exogènes (effet de type psychotrope, analgésique et addictif...) montre clairement l'importance de ce système endocannabinoïdérique. Il est nécessaire pour comprendre le rôle de ce système de citer les principaux endocannabinoïdes ainsi que leurs effets physiologiques.

c. Les endocannabinoïdes/endovanilloïdes

La découverte des récepteurs cannabinoïdes a rapidement conduit à définir les ligands endogènes ainsi que leurs rôles. Le premier endocannabinoïde présenté est le N-arachidonoyléthanolamide, plus connu sous son nom d'AEA (Devane et al., 1992). Le deuxième endocannabinoïde mis en évidence a été le 2-arachidonoylglycérol (2-AG) (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995). Ces deux principaux endocannabinoïdes ont une structure chimique assez proche des vanilloïdes. Ceci a permis de montrer que certains d'entre eux, tel que l'AEA et le 2-AG, pouvaient également se comporter comme des endovanilloïdes et activer les récepteurs TRPV1 (Ross et al., 2003; Zygmunt et al., 2013). De manière générale, les endocannabinoïdes/endovanilloïdes sont des dérivés lipidiques bioactifs intervenant dans la modulation de différentes fonctions biologiques (Kendall et Alexander, 2009).

1. L'anandamide

Comme explicité précédemment, l'AEA est le premier endocannabinoïde isolé à partir du cerveau de cochon par l'équipe de Devane et al. (1992). Ce composé appartient à la famille des



acides gras polyinsaturés. C'est un eicosanoïde composé d'une longue chaîne arachidonique associée à de l'éthanolamine (**Figure 16**). C'est un agoniste partiel des récepteurs cannabinoïdes avec une activité préférentielle sur les récepteurs CB1. L'AEA induit divers effets comme la stimulation de l'appétit, un effet analgésique/anti-inflammatoire ou encore des effets anticonvulsivants et antiprolifératifs

(Luchicchi et Pistis, 2012). L'AEA est également un agoniste des récepteurs TRPV1 pouvant en partie expliquer l'origine de ses propriétés antalgiques et antiprolifératives (Parolaro et al., 2002; Ross, 2003).

Les zones de production d'AEA au niveau cérébral sont corrélées avec l'expression des récepteurs CB1. Ainsi, il est possible de retrouver de l'AEA en concentration élevée au niveau de l'hippocampe, du thalamus, du striatum, du cervelet et du cortex (Marzo et al., 1994). Une synthèse périphérique importante d'AEA est également décrite au niveau de l'intestin, des testicules, de l'utérus et du cœur (Schmid et al., 1997). Les voies de métabolisme de l'AEA sont schématisées dans la **Figure 18** (Luchicchi et Pistis, 2012). L'AEA est un dérivé des phospholipides membranaires dont la

synthèse est initiée par la N-acyltransférase qui permet de convertir les phospholipides membranaires en N-arachidonoyphosphatidyléthanolamine (NAPE).

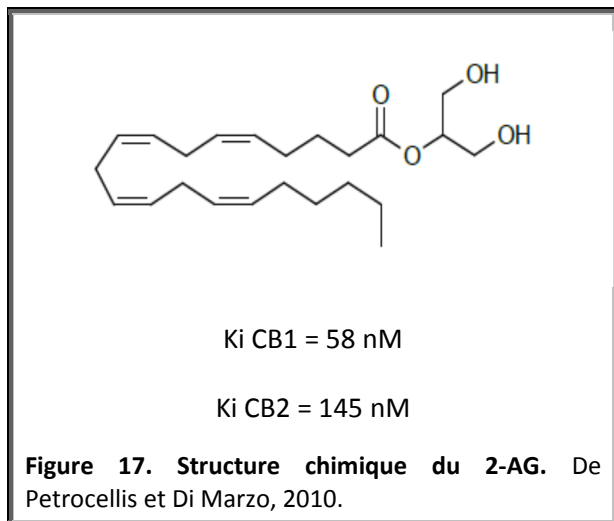
- La N-acyl phosphatidyléthanolamine phospholipase (NAPE-PLD) va directement synthétiser l'AEA à partir du NAPE ;
- La NAPE est métabolisé par les PLC (phospholipase C) en phosphoanandamide (p-AEA) et diacylglycerol (DAG). Le p-AEA sera ensuite déphosphorylé en protéine tyrosine phosphatase N22 (PTPN22) pour donner l'AEA ;
- La NAPE est métabolisée par la phospholipase A₂ (PLA₂) en lyso N-acyl phosphatidylethanolamine (lysNAPE), puis l' α,β -hydrolase 4 (ABHD4) va permettre de former la glycerol-phosphoanandamide (GP-AEA). La glycérophospho-diestérase 1 (GDE1) va ensuite libérer l'AEA à partir de la GP-AEA ;

Concernant la dégradation de l'AEA, il existe un transporteur membranaire qui recapte l'AEA, l'AMT, qui est ensuite majoritairement dégradé par l'enzyme FAAH (Lichtman et al., 2002; Luchicchi et Pistis, 2012).

Contrairement aux neurotransmetteurs habituels qui sont stockés dans des vésicules membranaires, cet l'AEA n'est pas stocké, de par sa nature lipidique, dans les vésicules, mais il diffuse librement au travers des membranes cellulaires. L'AEA est en fait directement synthétisé en cas de besoin par les neurones et astrocytes après stimulation de récepteurs induisant l'hydrolyse de ses précurseurs : les lipides membranaires (Giuffrida et al., 2001).

2. Le 2-arachydonoylglycérol

Le 2-AG est un ester issu de la condensation de l'acide arachidonique et du glycérol (**Figure 17**). Il est un agoniste entier des récepteurs CB1, mais aussi des récepteurs CB2, avec des taux



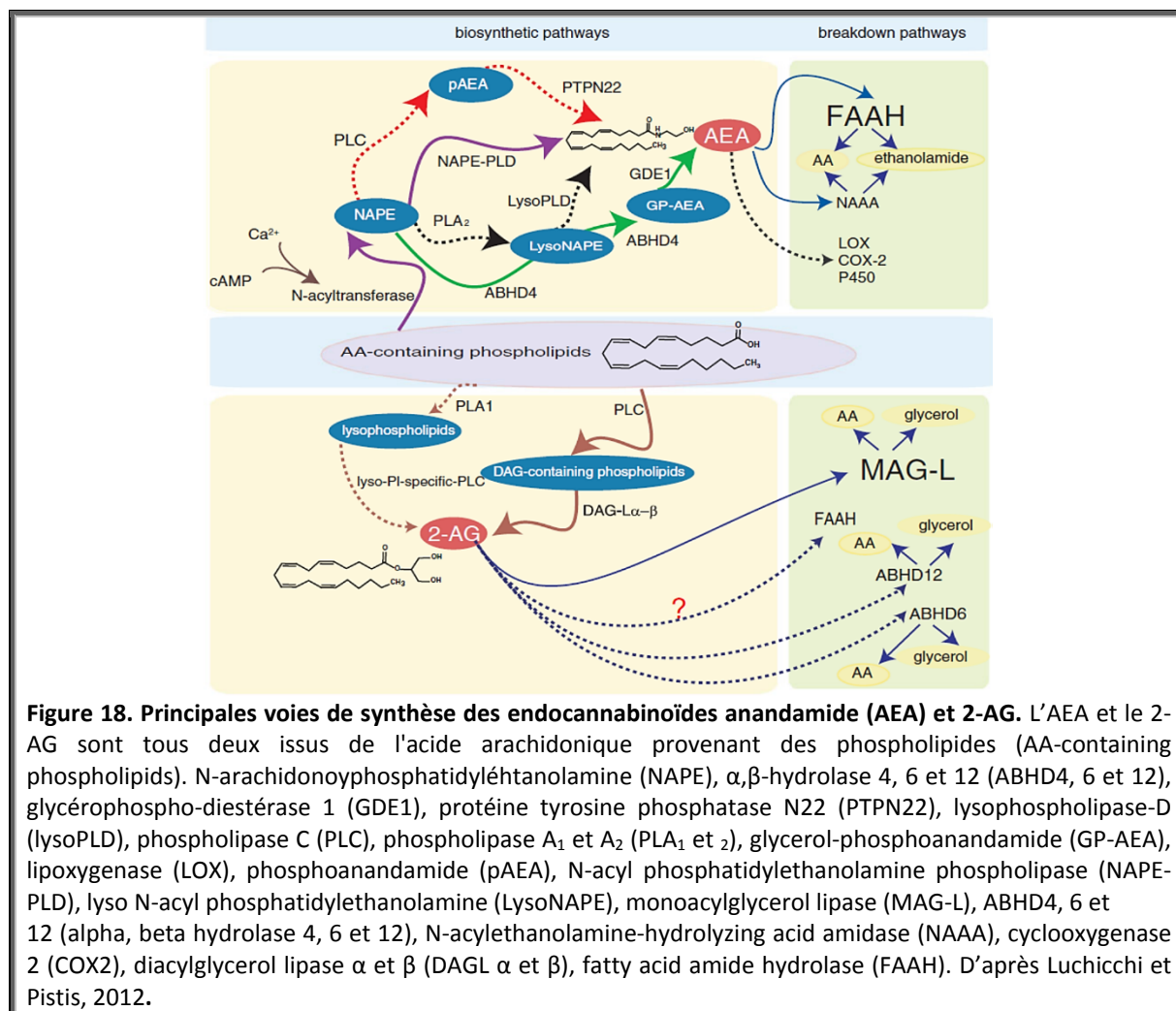
cérébraux plus importants que l'AEA, ce qui en fait l'endocannabinoïde principal (Luchicchi et Pistis, 2012). Plus récemment, il a été montré que ce dernier, comme l'AEA, avait la capacité de se lier également au récepteur TRPV1 (Zygmunt et al., 2013). Comme les endocannabinoïdes d'une manière générale, le 2-AG intervient dans plusieurs fonctions biologiques telles que l'apprentissage, la mémoire et le stress. Le 2-AG a montré également un rôle dans la modulation de

la douleur (Ameri, 1999; Parolaro et al., 2002; Ohno-Shosaku et Kano, 2014).

Comme l'AEA, la nature lipidique du 2-AG le rend difficilement stockable. Il est donc synthétisé sur demande *via* la stimulation de voies intracellulaires (Kano et al., 2009). Sa synthèse est possible dans les neurones selon deux voies (**Figure 18**) :

- La PLC hydrolyse les phospholipides membranaires pour produire du DAG. Ce dernier est ensuite converti par l'enzyme diacylglycérol lipase (DAGL) en 2-AG ;
- La deuxième alternative implique la génération de lysophospholipides par la PLA1, pouvant être hydrolysés en 2-AG par une lyso-PLC.

Sa dégradation fait intervenir majoritairement la MAGL qui permet de dégrader le 2-AG en acide gras et en glycérol. Dans une moindre mesure, la FAAH peut aussi dégrader le 2-AG (Lichtman et al., 2002; Kano et al., 2009; Luchicchi et Pistis, 2012).



d. Rôles physiologiques des récepteurs CB1

Les rôles physiologiques des récepteurs CB1 sont multiples, que ce soit la mémoire, l'anxiété, l'appétit, la douleur... (**Tableau 6**). Mais son agoniste naturel de référence, le Δ9-THC, a été majoritairement employé pour ses propriétés analgésiques. En effet, l'utilisation du cannabis pour soulager les douleurs est, comme nous l'avons vu précédemment, depuis longtemps connue dans la médecine traditionnelle. Mais de nos jours, les effets psychotiques du cannabis le classent dans les drogues prohibées. Une utilisation thérapeutique à des fins médicales est proscrite dans certains des pays.

Malgré tout, de nombreuses études précliniques ont montré les capacités des cannabinoïdes à soulager les douleurs aiguës comme chroniques, qu'elles soient d'origine inflammatoire ou neuropathique. Leurs efficacités sont comparables aux opioïdes (Walker et al., 2001; Walker et Huang, 2002). Des études cliniques concernant le potentiel analgésique des cannabinoïdes émergent, mais restent rares. Une expérimentation a montré que la consommation de marijuana et de dronabinol (analogue synthétique du Δ9-THC) diminue la sensibilité (de 3,56%) et augmente la

tolérance à la douleur (de 1,98%) par rapport au placebo. L'efficacité entre la marijuana et le dronabinol est similaire, mais le dronabinol à un effet qui perdure plus dans le temps (Cooper et al., 2013). D'autres travaux étudient la piste des dérivés du cannabis (naturel ou synthétique) dans le traitement de la douleur et observent des effets bénéfiques, mais parfois accompagnés des effets indésirables connus des cannabinoïdes (Ellis et al., 2009; Johnson et al., 2010; Wilsey et al., 2013). En revanche, une autre étude a été menée sur le potentiel analgésique d'un agoniste périphérique des récepteurs CB1/CB2 (AZD1940) sur une douleur induite par injection intradermale de capsaïcine. La conclusion a été décevante, car aucun effet antinociceptif n'est observé en comparaison au groupe placebo. Mais des effets indésirables (sédatifs et gastrointestinaux) ont été notés (Kalliomäki et al., 2013). Le système cannabinoïde est malgré tout une cible pharmacologique d'intérêt dans plusieurs domaines dont le traitement de la douleur. Le Sativex® en témoigne car ce médicament a reçu récemment son autorisation de mise sur le marché en France, mais son utilisation se limite au traitement des spasticités et contractures liées à la sclérose en plaques de patients adultes, résistants aux autres traitements. Les firmes pharmaceutiques ne se focalisent plus sur la synthèse d'analogue du $\Delta 9$ -THC, car il y a trop d'effets indésirables. Au vu des effets des cannabinoïdes endogènes, leurs intérêts résident maintenant dans la synthèse d'analogues des endocannabinoïdes. L'utilisation d'inhibiteurs du métabolisme des endocannabinoïdes montre également un grand intérêt dans le traitement de la douleur (Sařaga et al., 2014).

En résumé, les récepteurs CB1 sont une cible potentielle dans le traitement de la douleur, mais non dénuée d'effets indésirables et surtout d'aprioris.

Au niveau périphérique, l'expression de récepteur CB1 est retrouvée sur les terminaisons périphériques (Hohmann et Herkenham, 1999). Dans un modèle de douleur inflammatoire induite par injection i.pl. de carragénine, une injection localisée d'AEA induit une réduction de l'hyperalgie (Richardson et al., 1998b). L'article de Calignano et al. (1998) montre qu'une lésion périphérique entraîne la formation locale d'endocannabinoïdes qui peut participer intrinsèquement à moduler la douleur. Mais l'implication majeure du système endocannabinoïdérique dans la modulation de la douleur se situe au niveau central.

Au niveau spinal, les récepteurs CB1 sont exprimés au niveau des couches superficielles et profondes de la moelle épinière (Hegyí et al., 2009). Leurs activations après injections intrathécales (i.t.) d'agonistes CB1 se révèlent être antinociceptives (Lichtman et Martin, 1991; Hohmann et al., 1998; Chapman, 1999; Morisset et Urban, 2001). L'explication du mécanisme alors mis en jeu par les récepteurs CB1 concerne leur position pré-synaptique sur les fibres glutamatergiques. L'activation du récepteur CB1 réduit les courants excitateurs post-synaptiques et diminue donc la transmission du

message nociceptif provenant des fibres afférentes primaires (FAPs, Hohmann et al., 1998; Morisset et Urban, 2001).

Au niveau supra-spinal, une administration de cannabinoïdes peut supprimer la douleur induite par un *stimulus* thermique sur le test du « *tail-flick* » (Martin et al., 1993). Plusieurs régions cérébrales peuvent être impliquées dans ce phénomène d'analgésie au cannabinoïde, dont la SGPA et la moelle rostroventrale (« *Rostroventrale medulla* » ou RVM), deux régions primordiales à l'initiation de la modulation de la douleur *via* les contrôles descendants (Millan, 2002). L'administration au niveau de la SGPA d'agonistes cannabinoïdes induit un effet analgésique via cette axe SGPA-RVM en renforçant les contrôles descendants (de Novellis et al., 2005; Palazzo et al., 2012a). Une autre stratégie pharmacologique qui consiste à augmenter les taux endogènes d'endocannabinoïdes, grâce à l'utilisation d'inhibiteurs des enzymes de dégradation ou de recapture des endocannabinoïdes, induit également un effet antinociceptif (Maione et al., 2006; Lau et al., 2014). Cette dernière stratégie est assez séduisante, car elle permet d'éviter certains des effets pharmacologiques de la tétrade cannabinoïdique (Walker et Huang, 2002; Hohmann et Suplita, 2006). Le lien entre l'effet antalgique central des cannabinoïdes et les contrôles descendants est repris dans la revue de Dogrul et al. (2012b). Dans cette étude, il a été montré qu'une lésion des voies descendantes sérotoninergiques par injection i.t. d'une dose toxique de 5,7-DHT (5,7-dihydroxytryptamine) ou par une lésion chirurgicale bilatérale du faisceau dorsolatéral funiculus avait pour effet de bloquer l'effet antinociceptif d'agonistes CB1. Un effet similaire est retrouvé dans l'article de Seyrek et al. (2010) et de Mallet et al. (2008). Une injection i.t. d'antagonistes de différents sous-types de récepteurs 5-HT_{2A} et 5HT₇ montre que leurs blocages altèrent la réponse antinociceptive aux agonistes CB1, ce qui confirme l'implication des contrôles descendants sérotoninergiques (Seyrek et al., 2010). L'ensemble de ces données démontre le potentiel antalgique des cannabinoïdes, et souligne également que leurs mécanismes centraux sous-entendent une implication des contrôles descendants sérotoninergiques.

**MÉCANISME ANTALGIQUE DU PARACÉTAMOL : NOUVEAU CONCEPT D'UN
PROMÉDICAMENT À ACTION CENTRALE**

Tableau 6. Rôles des récepteurs CB1 dans différents systèmes biologiques.			
Système	Localisation	Rôle	Références
Mémoire et apprentissage	Hippocampe	Extinction de la mémoire spatiale	Robinson et al., 2008
	Amygdale basolatérale	Mémoire aversive	Azad et al., 2004 Marsicano et al., 2002
Anxiété	Amygdale basolatérale	Régulation de l'anxiété par les endocannabinoïdes	Gaetani et al., 2003 Bortolato et al., 2006 Kathuria et al., 2003
		Propriétés anxiolytiques des inhibiteurs du métabolisme (AM404, URB597, ...)	Hohmann et al., 2005 Busquets-Garcia et al. 2011 Han et al., 2013
Addiction	Aire ventrale tegmentale	Renforcement de l'addiction	Simonnet et al., 2013
	Noyaux accumbens Amygdale Système limbique	Utilisation potentielle des antagonistes dans la réduction des dépendances (ex : nicotine)	Cahill et Ussher, 2007 Cohen et al., 2002
Appétit	Hypothalamus Système limbique	Régulation de l'appétit et de la prise alimentaire	Kirkham et al., 2002
	Noyaux accumbens Glandes thyroïdes et surrénales Adipocytes Tractus gastrointestinal	Intérêt thérapeutique dans la stimulation de l'appétit Effet anti nauséeux et antiémétique du Δ^9 -THC	Pagotto et al., 2006 Jo et al., 2005

e. Implication du récepteur CB1 dans le mécanisme d'action antalgique du paracétamol

En 2006, un premier article mettait en évidence qu'un antagoniste CB1 prévenait l'effet antinociceptif du paracétamol (Ottani et al., 2006). Mais cette première étude présentait des limites notamment en utilisant des doses de paracétamol trop élevées qui se révèlent être toxiques (Kikkawa et al., 2006). En effet, l'utilisation de paracétamol à des doses aussi élevées entraîne une hypothermie et des effets locomoteurs pouvant induire un biais sur le test à modalité thermique ou sur le délai de la réponse motrice à un *stimulus* douloureux (Mallet et al., 2008).

L'interaction entre le mécanisme antalgique du paracétamol et l'implication du récepteur CB1 a été apportée par l'article de Mallet et al. (2008). Le constat était que l'administration systémique d'AM251, un antagoniste des récepteurs CB1, pouvait bloquer l'effet antalgique du paracétamol sur différents tests de douleur (test au formol, test de pression de patte..., **Figure 19A, B et C**). De plus, l'administration de paracétamol à des souris n'exprimant pas le récepteur CB1 (souris CB1^{-/-}, **Figure 19D**) n'induit aucun effet antinociceptif chez ces souris. D'autres interactions ont été démontrées entre le paracétamol et le système cannabinoïde. L'utilisation de paracétamol dans certaines études précliniques montre des effets similaires à l'utilisation d'agoniste CB1. En effet, il est retrouvé que le paracétamol améliore les interactions sociales et ceci dépendamment des récepteurs CB1 (Umathe et al., 2009; Gould et al., 2012).

Il faut noter qu'une implication centrale de ces récepteurs CB1 est largement suspectée sans avoir été prouvée. Plusieurs arguments tendent à montrer que l'AM404 issu du paracétamol, étant principalement formés au niveau cérébral, ce dernier potentialiserait l'augmentation des taux d'endocannabinoïdes cérébraux. Une étude a par ailleurs montré une augmentation des taux d'AEA dans le cortex préfrontal chez la souris 30 min après administration de paracétamol (100 mg/kg, i.p.) (Gould et al., 2012). Inversement, aucune variation des taux en AEA et 2-AG n'est observé dans le cerveau total après administration du métabolite intermédiaire du paracétamol, le p-aminophénol (100 mg/kg, i.p.) (Barrière et al., 2013). Cependant, cette méthode de quantification, par spectrométrie de masse dans le cerveau total, ne permet pas d'observer de possibles variations localisées en endocannabinoïdes, qui seraient dans ce cas alors dilué dans le signal global obtenu pour le cerveau total.

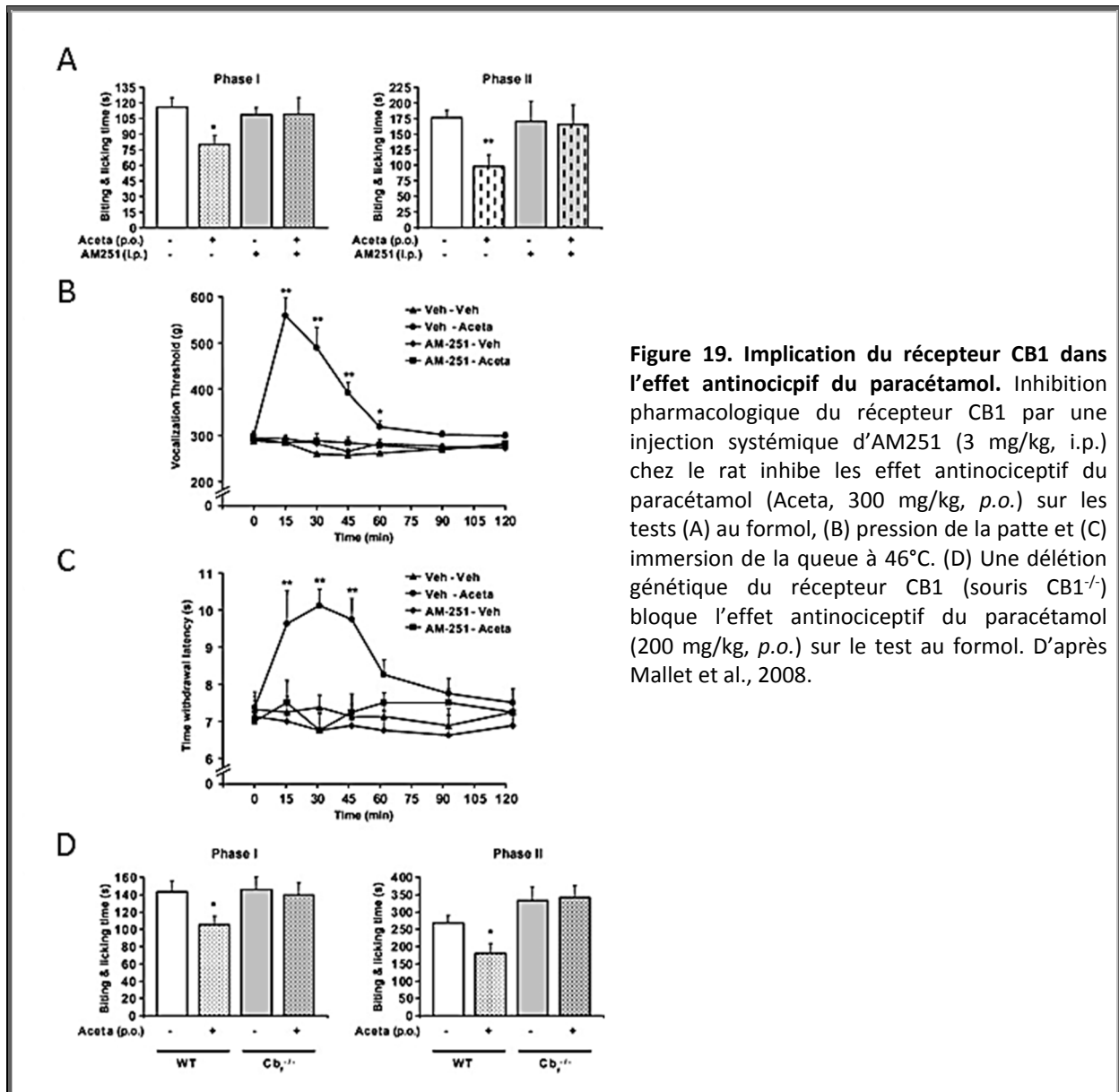


Figure 19. Implication du récepteur CB1 dans l'effet antinociceptif du paracétamol. Inhibition pharmacologique du récepteur CB1 par une injection systémique d'AM251 (3 mg/kg, i.p.) chez le rat inhibe les effets antinociceptifs du paracétamol (Aceta, 300 mg/kg, p.o.) sur les tests (A) au formol, (B) pression de la patte et (C) immersion de la queue à 46°C. (D) Une délétion génétique du récepteur CB1 (souris CB1^{-/-}) bloque l'effet antinociceptif du paracétamol (200 mg/kg, p.o.) sur le test au formol. D'après Mallet et al., 2008.

3. Paracétamol et canal calcique Cav3.2

a. Canal Cav3.2 : généralités

Les canaux calciques comptent deux familles : celle des canaux calciques à haut seuil d'activation (« *High Voltage Activated* », HVA) et celle à bas seuil d'activation (« *Low Voltage Activated* », LVA). Le canal Cav3.2 appartient au groupe des canaux LVA, et plus précisément de type T pour « *Tiny and Transient conductance* » en raison de leur faible conductance et de leur inactivation rapide. Cette dernière famille de canaux de type T est composée de 3 membres : Cav3.1, Cav3.2 et Cav3.3. Ces canaux sont largement distribués dans l'organisme, au niveau du cœur, du pancréas, du muscle lisse, des reins et du système nerveux. Leur large distribution laisse sous-entendre un rôle

important dans des processus biologiques, suggérant de nombreux effets indésirables des molécules qui les ciblent.

L'intérêt pour les canaux de type T, et plus spécifiquement le canal Cav3.2, concerne sa distribution au niveau du système nerveux dont les structures impliquées dans la douleur comme les neurones sensoriels et les DRG (Talley et al., 1999). Ces canaux sont également exprimés dans la corne dorsale et ventrale de la moelle épinière (Talley et al., 1999; François et al., 2015). Des enregistrements de courants de type T sont rapportés dans les petits et les moyens neurones des ganglions spinaux, justifiant une implication dans la transmission d'influx nerveux nociceptifs (Bourinet et al., 2005).

b. Rôle du canal Cav3.2 dans la douleur

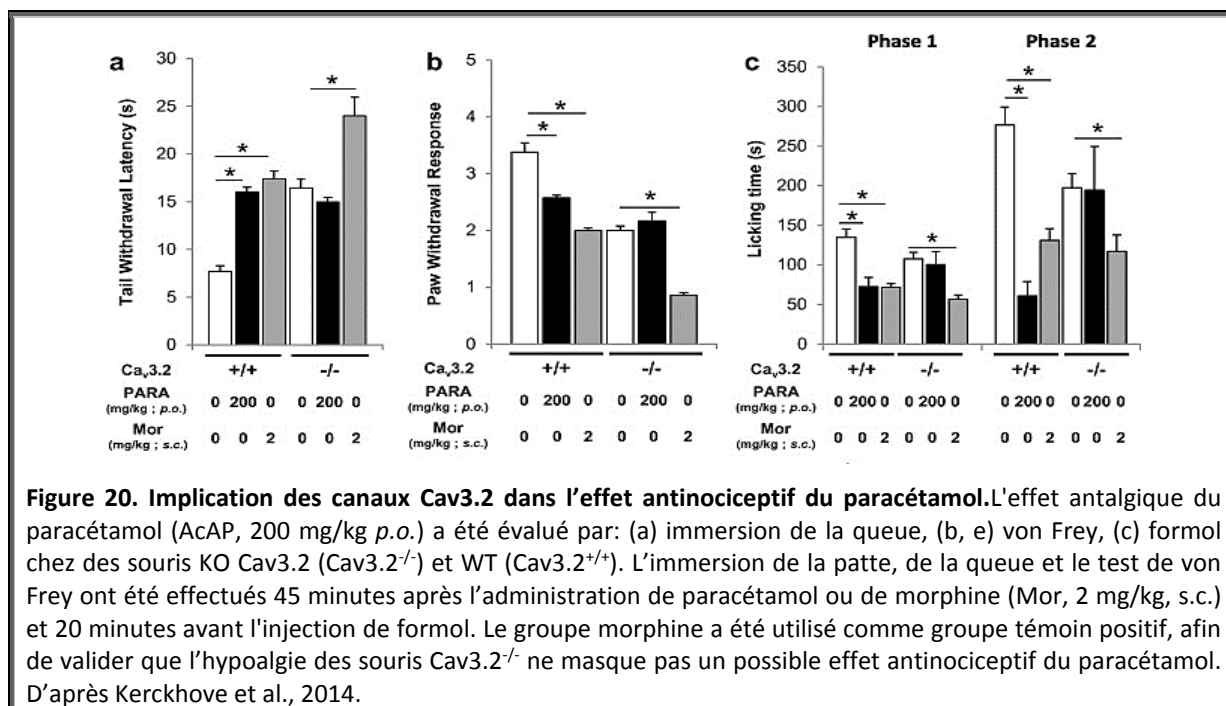
L'équipe de Bourinet et al. (2005) a contribué à mettre en évidence le rôle du canal Cav3.2 dans la douleur. Ces travaux ont montré que l'administration médullaire d'oligonucléotides antisens spécifiques de Cav3.2 réduisait considérablement la densité du courant électrique des neurones de petits et moyens calibres au niveau des ganglions spinaux, et augmente le seuil douloureux dans un modèle de douleur neuropathique. En contrepartie, l'administration des oligonucléotides antisens spécifiques de Cav1.3 et Cav3.3, ne modifie pas la réponse nociceptive. Ces résultats traduisent que l'activation de ces canaux Cav3.2 ont un effet pronociceptif. L'existence de souris Cav3.2^{-/-} montre chez ces souris un phénotype hypoalgique confirmant le rôle de ces canaux dans les processus pronociceptifs lors de son activation (Kerckhove et al., 2014). Par la suite, plusieurs études se sont intéressées au potentiel thérapeutique d'éventuels bloqueurs de ces canaux dans le traitement de la douleur, mais les outils pharmacologiques ayant une spécificité accrue pour les canaux Cav3.2 n'existent pas. D'autres stratégies consistant à employer des agents pharmacologiques moins spécifiques, mais ciblant malgré tous les canaux de type T, ont permis d'étudier ce canal. Les travaux de Dogrul et al. (2003) utilisent des antiépileptiques (éthosuximide et zonisamide) ou des antihypertenseurs (mibefradil) connus pour inhiber ce type de canaux et test leur capacité antalgique dans un modèle de douleur neuropathique induite chez l'animal par ligature du nerf spinale (« *spinal nerve ligation* »). Cette étude montre que l'éthosuximide et le mibefradil induisent une diminution dose-dépendante de l'allodynie et de l'hyperalgésie thermiques. D'autres tests de douleur ont également été étudiés, notamment dans le test au formol ou par injection i.pl. de capsaïcine, dans les deux cas l'éthosuximide montre un effet antinociceptif (Barton et al., 2005). Dans le cas de neuropathie chimio-induite chez l'animal par injection de vincristine ou de paclitaxel, l'éthosuximide soulage l'allodynie mécanique et thermique à un *stimulus* froid (Flatters et Bennett, 2004). D'autres études ont mis en évidence un effet significatif du bloqueur des canaux calciques voltage dépendant

dans des modèles de douleur neuropathique. L'absence de spécificité de ces molécules pour un sous-type de ces canaux de type T rend difficile l'étude du mécanisme du canal Cav3.2 dans les processus nociceptifs. Malgré tout, une série de molécules plus spécifiques découvertes et développées par le laboratoire Merck ont vu le jour : la famille des TTAs (« *T Type Antagonist* »). Cette famille compte plusieurs membres notamment le TTA-A2 marquant un puissant effet inhibiteur des canaux de type T. Son utilisation a montré son efficacité dans plusieurs modèles comme l'hypersensibilité viscérale ou dans un contexte de douleur inflammatoire (Francois et al., 2013; Kerckhove et al., 2014). Cependant, peu d'études cliniques ont testé leur efficacité dans la douleur. Quelques rares publications rapportent un effet antalgique en clinique tel que l'étude de cas de Takahashi et al. (2004), montrant 2 patients atteints de sévères douleurs post-AVC qui semblent être soulagés par l'inhibiteurs des canaux de type T, le zonisamide. Mais aucune explication mécanistique n'est donnée. Cependant, des projets cliniques sont actuellement en cours concernant l'utilisation de ces inhibiteurs de canaux calciques.

c. Interaction entre le paracétamol et le canal Cav3.2

Partant du constat que l'AM404 issu du paracétamol est un lipoaminoacide (Högstätt et al., 2005), et que les canaux de type T peuvent être modulés par des lipoaminoacides endogènes tel que l'AEA, un premier lien entre le paracétamol et ces canaux Cav3.2 a été proposé. Les travaux de Barbara et al. (2009) démontrent que l'utilisation de lipoaminoacides endogènes tels que le N-arachidonoyl glycine et l'acide N-arachidonoyl 3-OH- γ -aminobutyrique pouvait à la fois produire un effet antalgique sur une modalité thermique, et inhiber les courants des canaux de type T. Les études *in vivo* ont d'ailleurs clairement montré que cette analgésie thermique n'était pas retrouvée chez les souris Cav3.2^{-/-} ou après utilisation d'un antagoniste des canaux Cav3, le TTA-A2. Ces résultats laissent supposer que l'AM404 pourrait agir de la même manière. De récents travaux, concernant l'implication des canaux Cav3.2 dans le mécanisme d'action du paracétamol, ont permis de répondre à cette question (Kerckhove et al., 2014). Les résultats de cette étude démontrent qu'une **administration de paracétamol chez la souris produit un effet antinociceptif dépendamment des récepteurs Cav3.2** puisque cet effet n'est pas retrouvé chez les souris Cav3.2^{-/-} (**Figure 20**). Plus précisément, **l'administration intracérébrale d'AM404 induit un effet antinociceptif dépendant de ces canaux Cav3.2**. Cependant, l'effet de l'AM404 serait **indirect** puisque, dans cette même étude, des données électrophysiologiques suggèrent que l'AM404 a une **activité inhibitrice du canal Cav3.2** **indirect par le biais du récepteur TRPV1**. Cette étroite relation entre le canal Cav3.2^{-/-} et le récepteur TRPV1 a été confortée par l'effet antinociceptif produit par une administration en i.c.v. de l'antagoniste TTA-A2 mais non retrouvé chez les souris TRPV1^{-/-} (Kerckhove et al., 2014). Donc, le

mécanisme antinociceptif du paracétamol ferait intervenir **un mécanisme d'inhibition du canal Cav3.2 cérébrale par le biais des récepteurs TRPV1 supra-spinaux.**



4. Paracétamol et voies descendantes sérotoninergiques

a. La sérotonine : Généralités

La découverte de la sérotonine (5-HT) remonte à plus de 130 ans avec l'étude de Stevens et Lee (1884) indiquant la présence d'un agent endogène vasoconstricteur retrouvé au niveau du sang qui n'avait pas été encore décrit. En 1900, une autre étude montre que l'injection de sérum obtenu après coagulation du sang induit une augmentation du tonus vasculaire (Brodie et al., 1900). Il a fallu attendre 1933 avec la découverte d'une substance abondamment présente au niveau des cellules chromaffines de l'intestin nommée à l'époque entéramine (Vialli et Erspamer, 1933). Mais, le lien entre l'entéramine et cette substance endogène aux propriétés vasoconstrictrices n'est pas encore fait. En 1947, cette substance est alors appelée « sérotonine » provenant d'un jeu de mot « *serum-tonic* », en rapport avec ses propriétés vasotoniques (Rapport et al., 1947). Cette même équipe définit sa structure chimique. La 5-HT est alors identifiée comme étant la 5-hydroxytryptamine (5-HT, Rapport et al., 1948), permettant ainsi de montrer que la 5-HT et l'entéramine ne sont qu'une seule et même molécule (Erspamer, 1952).

La synthèse de la 5-HT est pour la première fois décrite en 1951 par Hamlin et Fischer (1951), ouvrant de nombreuses perspectives de recherche pour cette nouvelle molécule endogène aux propriétés biologiques complexes. La sérotonine est biosynthétisée à partir d'un acide aminé

essentiel, le tryptophane, qui est hydroxylé par la tryptophane-5-hydroxylase pour former le 5-hydroxytryptophane (HTP), puis décarboxylé par la 5-HTP-dopadécarboxylase pour donner la 5-HT (Figure 21). Sa métabolisation implique un mécanisme de recapture *via* un transporteur membranaire puis sa dégradation s'effectue par la monoamine-oxydase (MAO) de type A. Cette désamination oxydative produit de l'acide 5-hydroxyindole acétique (5-HIAA) qui s'élimine dans les urines (Figure 21).

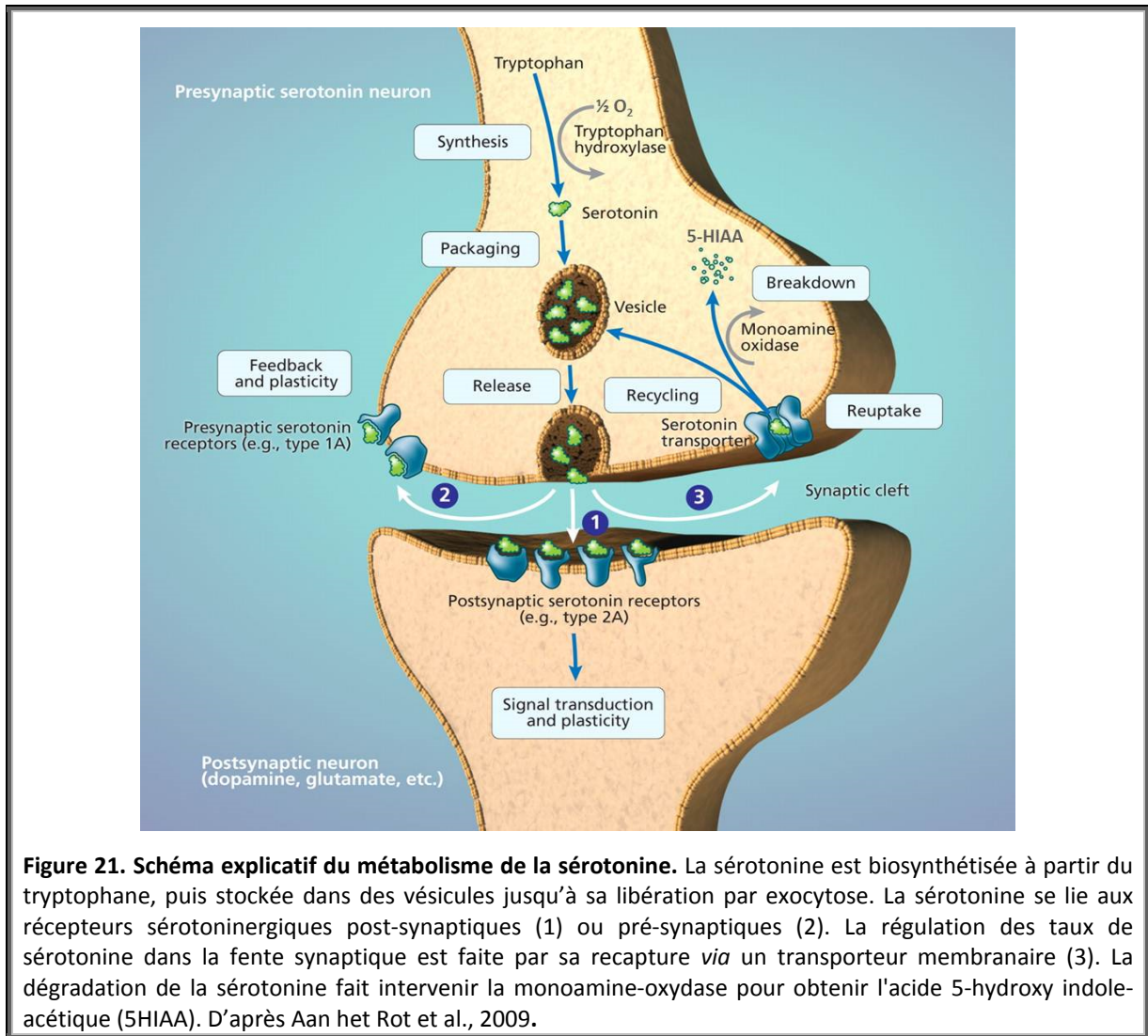


Figure 21. Schéma explicatif du métabolisme de la sérotonine. La sérotonine est biosynthétisée à partir du tryptophane, puis stockée dans des vésicules jusqu'à sa libération par exocytose. La sérotonine se lie aux récepteurs sérotoninergiques post-synaptiques (1) ou pré-synaptiques (2). La régulation des taux de sérotonine dans la fente synaptique est faite par sa recapture *via* un transporteur membranaire (3). La dégradation de la sérotonine fait intervenir la monoamine-oxydase pour obtenir l'acide 5-hydroxy indole-acétique (5HIAA). D'après Aan het Rot et al., 2009.

b. Les récepteurs

La découverte des récepteurs à la 5-HT remonte à 1957 lorsque Gaddum et Picarelli mirent en avant l'existence de deux récepteurs sensibles à la 5-HT. En effet, les premières études *in vitro* sur organes isolés ont permis de dissocier ces récepteurs à la 5-HT en type M et type D (Gaddum et Picarelli, 1957). L'évolution des techniques de clonage et de séquençage a permis de caractériser 14 types et sous-types de récepteurs pour la sérotonine. Suivant leurs caractéristiques fonctionnelles, structurales et pharmacologiques, ils ont été classés du récepteur 5-HT₁ à 5-HT₇ (Hoyer et al., 2002). La majorité de ces récepteurs appartiennent à la superfamille des récepteurs métabotropiques (couplés à une protéine G, RCPG), à l'exception du récepteur 5-HT₃ qui est constitué d'un canal cationique.

Le nombre important de sous-types de récepteurs et leurs différentes implications dans des processus biologiques reflètent la complexité du système sérotoninergique. Le sujet de cette thèse se focalisera sur l'implication de la sérotonine dans la douleur, plus particulièrement sur son rôle dans la modulation de la douleur *via* l'axe bulbo-spinal, appelé également voies descendantes sérotoninergiques. Les informations relatives aux différents récepteurs 5-HT et leurs rôles physiologiques dont la nociception sont détaillés dans le **Tableau 7**.

**MÉCANISME ANTALGIQUE DU PARACÉTAMOL : NOUVEAU CONCEPT D'UN
PROMÉDICAMENT À ACTION CENTRALE**

Tableau 7. Localisations et rôles dans la nociception des différents sous-types de récepteurs 5-HT. Fibres afférentes primaires (FAPs), neurones de projections (NP), interneurons inhibiteurs (interNI), système nerveux central et périphérique (SNC et SNP), substance grise périaqueducule (SGPA). D'après Hoyer et al., 2002; Bai et al., 2004; Muller et Jacobs, 2009; Pytliak et al., 2011.

Nom	Type	Effet	Localisation		Fonctions dans la nociception	Autres effets pharmacologiques
			Supra-spinale	spinale		
5-HT1A	Récepteur couplé une protéine G _{i/o}	Effet inhibiteur par la diminution intracellulaire d'AMPC	Hippocampe, ganglions de la base, noyaux du Raphé	I-II, V-VI, X	interNI GABAergique : pronociceptif NP : antinociceptif	SNC : agressivité, anxiété, appétit, émétique, impulsivité, mémoire, humeur, nociception, respiration, sommeil, sociabilité, thermorégulation, comportement sexuel Cardiovasculaires : pression sanguine, rythme cardiaque et autres fonction cardiovasculaire, vasoconstriction, érection Autres : dilatation des pupilles
5-HT1B			Ganglions de la base, noyaux du Raphé, tissus vasculaires, SGPA	I-II, IV	interNI: pronociceptif ? FAP et NP : antinociceptif	SNC : agressivité, anxiété, apprentissage, addiction, locomotion, mémoire, humeur, comportement sexuel Vasculaire : vasoconstriction pulmonaire, érection
5-HT1D			Trijumeau, putamen, noyaux accumbens, cortex olfactif, noyaux du Raphé, locus coeruleus, substance noire, SGPA	I, II, IV, X	Antinociceptif ?	SNC : locomotion, anxiété Vasculaire : vasoconstriction cérébrale
5-HT1E			Cortex entorhinal, putamen caudale, hippocampe et amygdale	Aucune donnée	Antinociceptif	SNC : mémoire
5-HT1F			Raphé dorsale, hippocampe, cortex, striatum, thalamus hypothalamus trijumeau	VI-V	Antinociceptif	Vasculaire : vasoconstriction SNC : locomotion ? anxiété ?
5-HT2A	Récepteur couplé une protéine G _{q/11}	Effet excitateur par l'activation d'une PLC et augmentation de la formation d'IP3 et de DAG	Cortex, ganglions de la base	Corne ventrale Corne dorsale (plus modérément)	FAP et NP : pronociceptif interNI : antinociceptif	SNC : anxiété, appétit, addiction, cognition, imagination, apprentissage, mémoire, humeur, perception, comportement sexuel, sommeil, thermorégulation Muscle lisse : contraction Vasculaire : vasoconstriction, vasodilatation Plaquettes : agrégation
5-HT2B			Hypothalamus, amygdale, cervelet, astrocytes	Corne dorsale	Pronociceptif	SNC : anxiété, appétit, sommeil Gastrointestinal : motilité Vasculaire : vasoconstriction Cardiovasculaire : fonction cardiovasculaire
5-HT2C			Majoritairement dans le plexus choroïdiens, cortex, noyau accumbens, hippocampe, amygdale, substance noire, SGPA	I, V-VI, X	FAP et NP : pronociceptif interNI : antinociceptif ?	SNC : anxiété, appétit, addiction, locomotion, humeur, comportement sexuel, sommeil, thermorégulation Gastrointestinal : motilité Vasculaire : vasoconstriction, érection
5-HT3	Récepteur ionotropique perméable au cation Na ⁺ /K ⁺	Effet excitateur par dépolarisation de la membrane cellulaire	Complexe vagal, centre du vomissement, hippocampe, amygdale	I-II-II, V-VI	FAP : pronociceptif interNI : antinociceptif ?	SNC et SNP : anxiété, addiction, nausées vomissement, apprentissage, mémoire, humeur, respiration, excitation neuronale Gastrointestinal : motilité, nausée, vomissement
5-HT4	Récepteur couplé une protéine G _s	Effet excitateur par la dépolarisateur de la membrane cellulaire	Système mésolimbique et nigrostrié, ganglion de la base, hippocampe	I-II	FAP et NP : pronociceptif	SNC : anxiété, appétit, apprentissage et mémoire, humeur, respiration Gastrointestinal : motilité
5-HT5A, B	Récepteur couplé une protéine G _{i/o}	Effet inhibiteur par la diminution intracellulaire d'AMPC	Cortex cérébral, hippocampe, habenula, noyaux du Raphé,	I-II, III-VI, X	5-HT _{5A} antinociceptif ?	SNC : locomotion, sommeil
5-HT6	Récepteur couplé une protéine G _s	Effet excitateur par la dépolarisateur de la membrane cellulaire	Tubercule olfactif, cortex frontal et entorhinal, noyaux accumbens, striatum, hippocampe, cervelet	Corne dorsale	Pronociceptif	SNC : anxiété, cognition apprentissage et mémoire
5-HT7	Récepteur couplé une protéine G _s	Effet excitateur par la dépolarisateur de la membrane cellulaire	Thalamus, gyrus denté, substance noire, aire ventrale tegmentale, dorsale Raphé, hippocampe, hypothalamus, cortex cingulaire	I-II	Couches superficielles Pré- et post-synaptiques	SNC : anxiété, mémoire, humeur, respiration, sommeil, thermorégulation Vasculaire : vasoconstriction

c. Rôle de la sérotonine dans la modulation de la douleur

Il est aujourd'hui clairement admis que le système sérotoninergique présente un rôle dans de nombreuses fonctions physiologiques. Cette monoamine est notamment impliquée dans le cycle éveil/sommeil, l'humeur, la dépression, la thermorégulation, le tonus vasculaire et la motilité intestinale, mais surtout dans la douleur et l'inflammation (Muller et Jacobs, 2009).

Le rôle de la sérotonine dépend du lieu de sa synthèse et du type de récepteurs mis en jeu. Il faut savoir que les effets de la 5-HT sur les neurones peuvent être excitateurs ou inhibiteurs suivant la nature des récepteurs et leurs localisations (prés- ou post-synaptique, Muller et Jacobs, 2009).

Le rôle de la 5-HT au niveau périphérique est synonyme d'effet pronociceptif (**Figure 22**). L'administration exogène de 5-HT agit comme un agent pro-inflammatoire provoquant une inflammation et une hyperalgie, que ce soit chez l'homme ou chez le rat (Loyd et al., 2013). La source principale de sérotonine périphérique provient des plaquettes et des mastocytes. La 5-HT impliquée dans la nociception est alors libérée en réponse à une inflammation (Sommer et al., 2004). Le lien entre l'inflammation et les taux de sérotonine a été étudié. Une augmentation des taux de 5-HT est observée localement lors d'une lésion périphérique, qui est corrélée à l'apparition d'une allodynie et d'une hyperalgie (Sommer, 2004; Nakajima et al., 2009). Le mécanisme périphérique de cet effet proalgique de la 5-HT est due à (1) une augmentation de l'influx nerveux des fibres nociceptives et (2) une augmentation de la libération d'agents pro-inflammatoires (**Figure 22**).

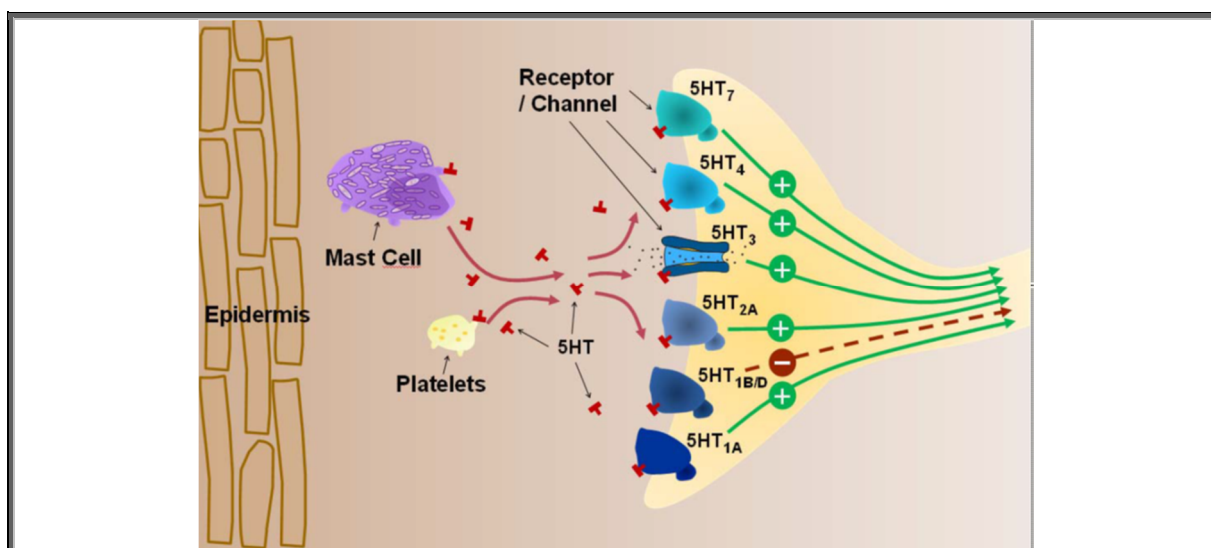


Figure 22. Rôle des récepteurs 5-HT dans la nociception au niveau périphérique. Une lésion périphérique des tissus engendre un processus inflammatoire. La libération de 5-HT est alors stimulée et l'activation des récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃, 5-HT₄ et 5-HT₇ sont en faveur un effet pronociceptif, tandis que les récepteurs 5-HT_{1B} sont en faveur d'un effet antinociceptif. D'après Muller et Jacobs, 2009.

Au niveau médullaire, la 5-HT a une fonction très importante dans la transmission et la modulation de la douleur. Ces récepteurs sont recrutés par les contrôles descendants sérotoninergiques. Ainsi, ils participent à la facilitation ou à l'inhibition de la transmission du message nociceptif (**Tableau 7**). L'effet pro- ou antinociceptif d'une injection i.t. de 5-HT découle du récepteur alors recruté qui dépendant alors à la fois de la dose de 5-HT et de la nature du *stimulus* douloureux (Bardin et al., 1997, 2000a, 2000b; Bonnefont et al., 2005). À titre d'exemple, les récepteurs 5-HT₁ peuvent être associées à un effet pro- ou antinociceptif au niveau spinal (Yang et al., 2014). L'administration i.t. d'agonistes des différents sous types de récepteurs 5-HT₁, et plus particulièrement du récepteur 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT, 30-300 nmol), montre un effet antinociceptif sur une douleur aiguë (Jeong et al., 2012). Une diminution de l'amplitude des courants électriques excitateurs est également observée avec l'administration de l'agoniste 5-HT_{1A} (Jeong et al., 2012). Inversement, une autre étude montre que pour le même agoniste à des doses plus élevées (8-OH-DPAT, 0,305, 1,525, 3,05, et 15,25 mM) un effet facilitateur des courants excitateurs des fibres C et Aδ est observé (Zhang et al., 2001). L'activation des récepteurs 5-HT₂ sont synonymes d'effet pronociceptif (Yang et al., 2014). L'injection d'antagonistes des récepteurs 5-HT_{2A,B,C} provoque une inhibition des courants excitateurs issue des fibres C (Rahman et al., 2011). Des travaux très intéressants de Kayser et al. (2007) sur différentes souches de souris ayant une délétion génétique pour un sous-type de récepteur à la sérotonine montrent l'implication dans la douleur des différents récepteurs. Une délétion pour le récepteur 5-HT_{1A} se traduit par une plus grande sensibilité des souris au test thermique de la plaque chaude et les souris 5-HT_{1B}^{-/-} montrent une plus grande sensibilité au test au formol. Quant à la lignée de souris 5-HT_{2A}^{-/-} et 5-HT₃^{-/-}, elles présentent un phénotype inverse avec une diminution des réponses nociceptives au test au formol. Cependant, la délétion génétique ne se restreint pas à l'étage spinal et concerne une délétion globale. Les effets ne résument donc pas l'implication spinale de ces récepteurs dans la douleur. Un récapitulatif des effets au niveau spinal des différents sous-types de récepteurs est décrit dans le **Tableau 7**.

Le rôle clé de la 5-HT dans la douleur au niveau supra-spinal a suscité de nombreuses recherches. Avec la noradrénaline, la 5-HT est reconnue comme le principal neurotransmetteur dans les processus de modulation de la douleur (Basbaum and Fields, 1984; Millan, 2002). Contrairement à son action périphérique, une activation centrale des récepteurs 5-HT conduit un effet antinociceptif ou pronociceptif, en fonction des récepteurs recrutés (**Tableau 7**). Concernant la modulation de la douleur par la 5-HT, de nombreuses structures partant des centres supérieurs jusqu'à la moelle épinière sont mises en jeu. Ces structures sont rassemblées en un système appelé voies descendantes sérotoninergiques.

d. Voies descendantes sérotoninergiques dans la douleur

La perception d'une sensation douloureuse nécessite un ensemble de systèmes qui permet d'intégrer le message nociceptif partant de la périphérie et des fibres afférentes primaires, jusqu'aux centres supérieurs *via* les neurones de projection. Afin de répondre à l'excès de nociception, le corps est capable de réagir en modulant cette douleur. Il existe un système de modulation de la douleur provenant des centres supérieurs *via* un axe bulbo-spinal. Cette voie permet de refréner le message nociceptif au niveau médullaire et fait intervenir majoritairement la sérotonine (Millan, 2002). Cet axe implique différentes structures partant des zones corticales du cerveau jusqu'à la moelle épinière en passant par le tronc cérébral (**Figure 23**). Leurs implications dans la modulation de la douleur ont été justifiées par les effets antinociceptifs ou pronociceptifs induits lorsque ces régions sont soumises à des stimulations électriques, des lésions ou l'injection localisée de substances pharmacologiques excitatrices ou inhibitrices. Depuis maintenant presque 20 ans, plusieurs études concernant le mécanisme mis en jeu dans l'effet antinociceptif du paracétamol ont montré que celui-ci faisait intervenir la sérotonine (Tjølsen et al., 1991; Pini et al., 1996), faisant le lien avec ces contrôles descendants sérotoninergiques. Avant de discuter du lien entre le paracétamol, la sérotonine et les contrôles descendants modulateurs de la douleur, il est nécessaire de décrire précisément ces voies descendantes sérotoninergiques. Ainsi, les structures impliquées partant du cortex jusqu'à la moelle épinière seront décrites ci-dessous.

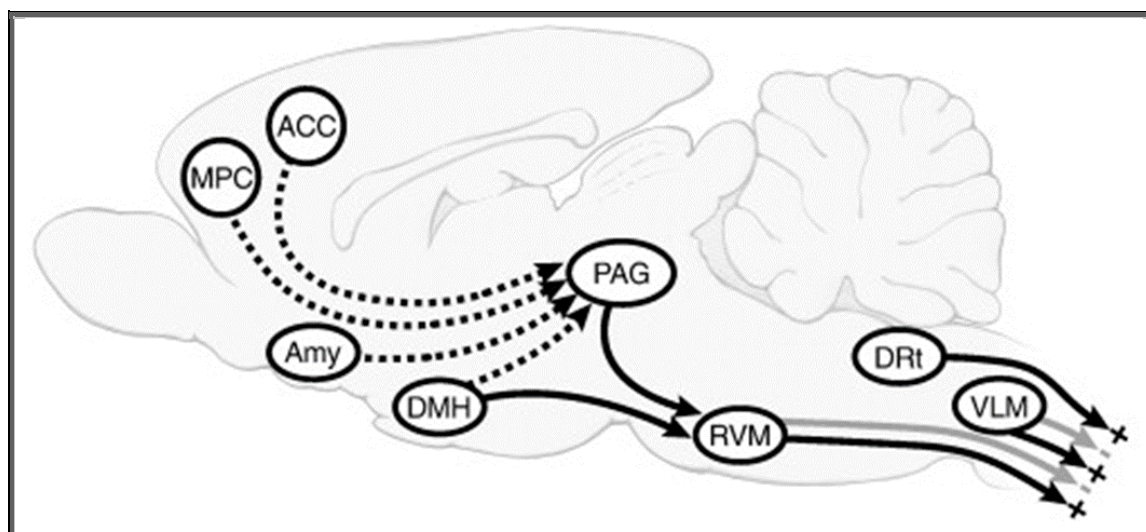


Figure 23. Schéma général des voies descendantes sérotoninergiques. L'axe PAG-RVM exerce un contrôle bidirectionnel sur la transmission du message nociceptif au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. La SGPA reçoit à son tour des afférences des centres supérieurs (le système limbique) pouvant moduler son activité. *Anterior cingulate cortex (ACC), amygdala (AMY), dorsomedial nucleus of the hypothalamus (DMH), medial prefrontal cortex (MPC) periaqueductal gray matter (PAG).* D'après Heinricher et al., 2009.

1. Cortex cérébral et hypothalamus

Les centres supérieurs impliquent un ensemble de structures qui sont à la fois impliquées dans la perception, la localisation et l'aspect émotionnel de la douleur. Ces structures peuvent en retour moduler l'axe bulbo-spinal des contrôles descendants sérotoninergiques afin de faciliter ou inhiber la douleur. Parmi ces structures nous retrouvons : le cortex somatosensoriel S1 et S2, la partie antérieure de l'insula et le gyrus cingulaire, mais aussi le thalamus, l'hypothalamus et l'amygdale. La revue de Millan et al. (2002) résume l'ensemble des études montrant que l'activation de plusieurs de ces régions est directement ou indirectement corrélée à une activation des voies descendantes sérotoninergiques avec un effet antinociceptif. Le point commun entre toutes ces régions est le lien avec la SGPA, qui est la structure la plus impliquée, avec la RVM, dans les contrôles descendants sérotoninergiques (Stamford, 1995).

2. La substance grise périaqueducale

La substance grise périaqueducale (SGPA) possède un rôle clé dans la modulation de la douleur *via* les voies descendantes sérotoninergiques. Elle se comporte comme un relais entre les messages ascendants nociceptifs et les contrôles descendants. La découverte de son implication dans les contrôles endogènes de la douleur provient de l'analgésie profonde induite par sa stimulation électrique (Reynolds, 1969). D'autres études électrophysiologiques et pharmacologiques ont permis de mieux comprendre l'initiation de ces contrôles descendants.

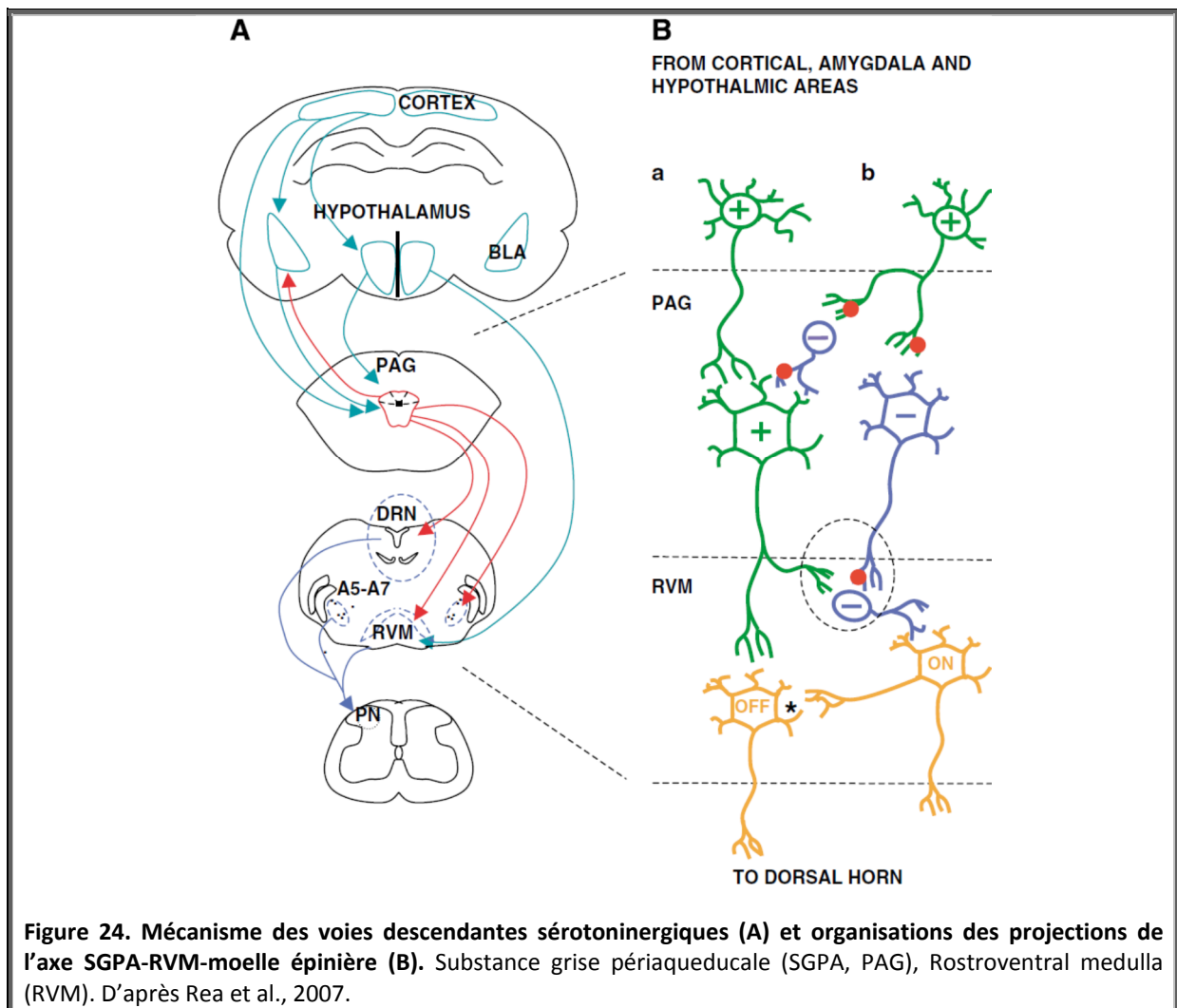
Le rôle fonctionnel de la SGPA dans les contrôles descendants n'est pas parfaitement défini, plusieurs hypothèses persistent concernant sa structure hiérarchique. Malgré tout, une notion récurrente ressort : l'activité de ce noyau est à la fois sous un contrôle exciteur glutamatergique et un tonus inhibiteur GABAergique. En effet, l'activation de la SGPA est dépendante de cet équilibre glutamatergique/GABAergique (**Figure 24**). En fonction du contexte, la balance pourra pencher soit en faveur d'une activation des voies descendantes pour inhiber le message nociceptif au niveau médullaire, soit pour une inhibition de ces voies et donc une facilitation de la douleur (Millan, 2002; Vanegas and Schaible, 2004).

Des travaux ont été menés pour étudier l'implication du GABA et du glutamate dans la modulation de la douleur. Il a été démontré que l'administration dans la SGPA d'agonistes ou antagonistes des récepteurs mGLU pouvait induire un effet antinociceptif, dépendant du récepteur mGLUR recruté : l'activation des récepteurs mGLUR1, 5, 2, 3 et 8 produit un effet antinociceptif alors que l'activation du récepteur mGLUR7 entraîne un effet pronociceptif (Palazzo et al., 2014). L'activité de la SGPA est également dépendante d'un fort tonus inhibiteur GABAergique (Lau et Vaughan, 2014). Ces mêmes fibres expriment des récepteurs cannabinoïdes et opioïdes, capables lors de leur activation d'inhiber ce tonus GABAergique, et permettant alors de démasquer l'activation des voies

MÉCANISME ANTALGIQUE DU PARACÉTAMOL : NOUVEAU CONCEPT D'UN PROMÉDICAMENT À ACTION CENTRALE

descendantes (Lau et Vaughan, 2014). Ce même mécanisme explique l'effet analgésique des agonistes opioïdiques et cannabinoïdiques, qu'ils soient issus de sources endogènes ou exogènes (Lau et al., 2014). Il existe de nombreux mécanismes cellulaires capables de moduler l'activité de la SGPA, ce qui explique toute la complexité pour définir un schéma universel de la structure et du fonctionnement de la SGPA.

Depuis longtemps, il a été démontré que l'activation de SGPA était corrélée à une libération médullaire de 5-HT (Yaksh et Tyce, 1979; Hammond et al., 1985). L'administration i.t. d'antagonistes des récepteurs 5-HT inhibe les effets antinociceptifs induits par l'activation de la SGPA (Yaksh, 1979; Yaksh et Tyce, 1979). La SGPA n'a cependant peu ou pas de projection directe vers la moelle épinière, il y a donc intervention d'un autre noyau qui fait office de relais. Le lien fonctionnel entre la SGPA et la moelle épinière est la RVM (Behbehani et Fields, 1979; Gebhart, 1982).



3. La rostroventrale medulla

Des études tendant à montrer que la RVM est un noyau relais entre la SGPA et la moelle épinière dans les contrôles descendants sérotoninergiques ont démontré que :

- Une injection d'opioïde dans la PAG produit à la fois une antalgie et une activation des neurones de la RVM (Cheng et al., 1986).
- Une lésion ou un blocage pharmacologique de la RVM abolit l'antalgie produite par une stimulation de la SGPA (Akil et Mayer, 1972; Behbehani et Fields, 1979; Gebhart et al., 1983; Aimone et Gebhart, 1986).
- La stimulation électrique de la RVM induit une libération de 5-HT médullaire accompagnée d'un effet antinociceptif (Rivot et al., 1982).

Ainsi, la RVM est un noyau impliqué dans la continuité de la SGPA dans l'action analgésique des voies sérotoninergiques descendantes (**Figure 24**). Mais que savons-nous de la RVM ? Ce noyau est localisé dans la région du tronc cérébral. Il est dissocié en plusieurs sous parties : le noyau raphé magnus, le noyau reticularis paragigantocellularis, gigantocellularis pars et le noyau reticularis paragigantocellularis lateralis (Paxinos, 2014). Comme précédemment expliqué, il reçoit des afférences provenant entre autre de la SGPA. La RVM projette également 3 classes de neurones particulièrement importants dans ces contrôles descendants, au niveau des cornes dorsales de la moelle épinière (couches I, II et V, Heinricher et al., 2009) :

- Les cellules OFF ont une activité tonique inhibitrice, diminuée à la suite d'une stimulation douloureuse. Les cellules OFF sont impliquées dans l'inhibition de l'activité neuronale spinale.
- Les cellules ON, qui sont excitées en réponse à une stimulation douloureuse, augmentent la nociception et contribuent à l'hypersensibilité retrouvée dans plusieurs états douloureux.
- Les cellules NEUTRES ne semblent pas interagir dans les processus physiologiques de la douleur.

Le système et la nature des cellules ON/OFF est un sujet à controverse et pourrait être plus complexe (Gao et Mason, 2000, 2001). Longtemps considérées comme sérotoninergiques (Millan, 2002), il semblerait que seules les cellules NEUTRE le soient (Gao et Mason, 2000; Winkler et al., 2006; Heinricher et al., 2009). Une étude a montré que 60% des cellules ON et OFF expriment l'enzyme glutamate decarboxylase associé aux fibres GABAergiques. Cependant, le rôle du GABA n'est pas encore connu (Winkler et al., 2006; Heinricher et al., 2009).

De manière concomitante, ces 3 unités cellulaires (principalement les cellules ON/OFF) vont moduler le passage du message nociceptif provenant des FAPs, soit en faveur d'une facilitation de la douleur, soit en faveur d'une inhibition de la douleur. La réponse spécifique et bidirectionnelle permet lors d'un processus douloureux l'activation de la boucle spino-bulbo-spinale, qui viendrait respectivement inhiber les cellules ON et activer les cellules OFF pour *in fine* réduire la transmission nociceptive spinale. Il est important de noter que dans certaines conditions pathologiques, cette boucle spino-bulbe spinale présente des mécanismes de plasticité comme dans les cas de lésions nerveuses. Cette boucle va alors pencher en faveur d'une hyperexcitabilité des neurones médullaires qui semble contribuer aux phénomènes de sensibilisation centrale se traduisant par une allodynie et une hypersensibilité chronique (Zeitl et al., 2002; Rahman et al., 2006). En contrepartie, dans les douleurs chroniques inflammatoires, la balance inhibitrice de message nociceptif semble prévaloir (Zhao et al., 2007; Wei et al., 2010). L'activité de cet axe SGPA-RVM-moelle épinière diffère donc en fonction des conditions physiopathologiques (Cf. **3^{ème} chap.II.2. Adaptation et plasticité de la SGPA en condition physiopathologique**).

4. Couches supérieures de la corne dorsale

La diversité des récepteurs, leurs localisations et leurs fonctions rendent complexe la compréhension précise du mécanisme par lequel la transmission du message nociceptif est inhibée ou facilitée. Les projections des cellules ON/OFF modulent directement l'influx nociceptif par la libération de 5-HT, qui vont différenciellement se fixer sur les récepteurs pré- et post-synaptiques des FAPs et des neurones de second ordre. Ainsi, en fonction de la nature des récepteurs 5-HT (**Tableau 7**), l'influx nociceptif provenant des FAPs sera soit inhibé, soit facilité (Millan, 2002). D'autres neurones peuvent aussi intervenir dans la modulation médullaire de la transmission du message nociceptif. Il existe des interneurons GABAergiques et enképhalinerigiques qui, sous le contrôle de ces cellules ON/OFF de la RVM, peuvent également réguler l'activité des FAPs et des neurones de projections (Millan, 2002). Concernant la dualité des effets des différents sous-types de récepteurs à la 5-HT au niveau médullaire, il a été rapporté que les récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B/D} et 5-HT₇ sont responsables des effets antinociceptifs, tandis que l'activation des récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT₃ sont plutôt responsables des effets pronociceptifs (Benarroch, 2008; Braz et Basbaum, 2008; Seyrek et al., 2010). L'implication des différents récepteurs dépend de la nature des *stimuli* douloureux et du contexte physiopathologique.

*e. Paracétamol et renforcement des voies descendantes
sérotoninergiques*

Le premier constat sur l'implication des contrôles descendants sérotoninergiques dans le mécanisme d'action antalgique du paracétamol est issu des travaux de Pini et al. (1996). Les résultats issus de cet article montrent une corrélation entre l'administration de paracétamol et une augmentation des taux de sérotonine au niveau du cortex et du tronc cérébral. Une déplétion des stocks de sérotonine par l'administration de pCPA (p-Chlorophénylalanine, 100 mg/kg/jour pendant 4 jours) inhibe à la fois cette augmentation de sérotonine et l'effet antinociceptif du paracétamol (Pini et al., 1996; Miranda et al., 2003). Une autre preuve a permis d'enrichir l'hypothèse du renforcement des contrôles descendants sérotoninergiques. Une lésion de ces voies descendantes sérotoninergiques, par injection i.t. de 5,7-DHT, altère les effets antinociceptif du paracétamol chez l'animal sain ou dans un modèle de douleur postopératoire (incision plantaire, Tjølsen et al., 1991; Dogrul et al., 2012a). La possibilité d'une implication des contrôles descendants adrénergiques est exclue, car la lésion de ces voies par l'injection de 6-OHDA (6-hydroxydopamine hydrobromide) n'altère par le potentiel antalgique du paracétamol (Tjølsen et al., 1991).

Plusieurs études ont évalué l'implication spinale des récepteurs à la 5-HT dans l'effet antalgique du paracétamol. La conclusion a été qu'il n'y a pas un ou plusieurs sous-types de récepteurs particulièrement impliqués, mais que tout dépend de la nature du *stimulus* nociceptif. Le **Tableau 8** ci-dessous résume l'implication des différents sous-types de récepteurs 5-HT dans l'effet antinociceptif du paracétamol. Il est à noter que certains récepteurs à la 5-HT au niveau médullaire ont un rôle dans le mécanisme antinociceptif du paracétamol.

Ces données précliniques ont confirmé l'hypothèse d'un renforcement des voies descendantes modulatrices de la douleur par le paracétamol. Par la suite, des études cliniques ont été mises en place pour valider cette hypothèse. La première étude de Pickering et al. (2006) a étudié l'impact chez 30 volontaires sains de l'administration de paracétamol (1 g, *p.o.*) avec ou sans antagonistes des récepteurs 5-HT₃ (topisétron et granisétron). L'effet antalgique du paracétamol est bloqué lors de sa co-administration avec chacun des deux inhibiteurs. Il est intéressant de noter que cette étude était motivée par l'association fréquente du paracétamol et de ces inhibiteurs 5-HT₃ (pour leurs effets antiémétiques) lors de protocole de chimiothérapie. D'après ces résultats, cette association pourrait être délétère pour l'effet antalgique du paracétamol. En 2008, une deuxième étude clinique a souhaité confirmer l'implication plus spécifiquement des voies descendantes sérotoninergiques dans l'action antalgique du paracétamol (Pickering et al., 2008). L'utilisation d'une stimulation douloureuse rapide au froid (« *cold pressor test* ») permet le recrutement des contrôles descendants, puisque les seuils de douleur augmentent après la deuxième stimulation. Ainsi, le

paracétamol permet d'amplifier l'augmentation des seuils de douleurs à la deuxième stimulation, traduisant un renforcement des contrôles descendants. Cependant, l'association du topisétron avec le paracétamol provoque une perte de ce renforcement, démontrant un recrutement des contrôles descendants sérotoninergiques par le paracétamol (Pickering et al., 2008).

Tableau 8. Résumé des répercussions de l'inhibition de différents sous-types de récepteurs 5-HT dans l'effet antalgique du paracétamol. L'administration des différents antagonistes est localisée au niveau médullaire (injection intrathécale). (+) indique une inhibition de l'effet antinociceptif du paracétamol par l'antagoniste, et (-) signifie qu'il n'y a pas eu d'inhibition. D'après Pelissier et al., 1995, 1996; Alloui et al., 1996, 2002; Bardin et al., 1997, 2000; Courade et al., 2001b; Bonnefont et al., 2003a, 2005, 2007; Libert et al., 2004; Dogrul et al., 2012b; Liu et al., 2013.

Différents récepteurs 5-HT bloqués	Nature du stimulus		
	Chimique	Mécanique	Thermique
5-HT _{1A}	+	-	
5-HT _{1B}	-	+	
5-HT _{2A}	-	+	-
5-HT _{2C}	-	+	
5-HT ₃	-	+	
5-HT ₇	+		+

Il faut également prendre en compte que le topisétron se révèle non spécifique des récepteurs 5-HT₃. Il ne faut donc pas exclure l'implication d'autres récepteurs sérotoninergiques ou non sérotoninergiques qui seraient topisétron-dépendant (Pickering et al., 2006; Bandschapp et al., 2011). Une étude contredit notamment l'inhibition de l'action du paracétamol par le topisétron (Tiippana et al., 2013). Les résultats indiquent que l'utilisation de paracétamol en i.v. (2 g) n'induit pas d'effet analgésique sur un *stimulus* électrique ou sur un test thermique au chaud, et ne renforce pas les contrôles descendants par le « *cold pressor test* ». Mais, contrairement à l'étude de Pickering et al. (2008) la voie d'administration du paracétamol et les tests utilisés ne sont pas les mêmes.

La modulation des voies descendantes sérotoninergiques par le paracétamol a été malgré tout de nombreuses fois montrée par diverses méthodes cliniques et précliniques, confortant par la même occasion que le mécanisme d'action antalgique du paracétamol sous-entend un effet central qui pourrait être initié au niveau supra-spinal (Mallet et al., 2008, 2010; Pickering et al., 2008).

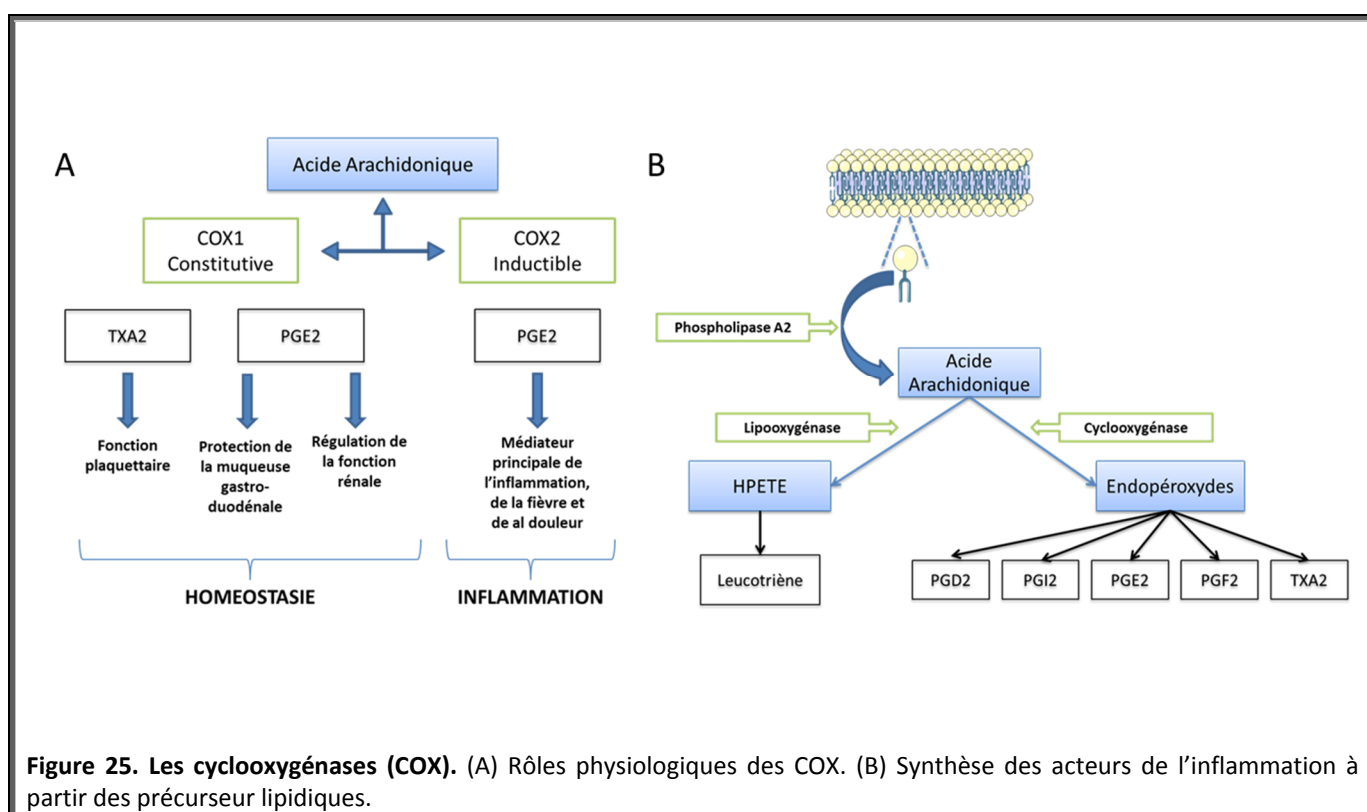
IV. Les autres hypothèses du mécanisme d'action antalgique du paracétamol

Après plusieurs décennies de recherche, le mécanisme d'action antalgique du paracétamol est devenu très controversé (Toussaint et al., 2010). Les doutes émis laissent place à plusieurs hypothèses mécanistiques, qui seront explicitées et discutées dans ce chapitre.

1. Le paracétamol : un AINS ? La controverse sur l'implication du système des cyclooxygénases

a. Système des COX

Les cyclooxygénases (COX), encore appelées prostaglandine H2 synthétases, sont des enzymes qui interviennent dans les états inflammatoires. Leurs découvertes par Sir John Vane lui valurent un prix Nobel de Médecine en 1982. La fonction principale des COX est la métabolisation de l'acide arachidonique en PGE₂ ayant un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie (**Figure 25A**). Ce n'est que 20 ans plus tard, en 1990, que sont découvertes les deux isoformes, COX1 et COX2 (Vane et al., 1994). La COX1 est exprimée de façon constitutive et responsable du taux basal en PGE₂. Quant à la COX2, elle est exprimée de façon inductible et impliquée en particulier dans les réactions inflammatoire (**Figure 25B**).



1. COX 1

La COX1 représente la forme constitutive qui est exprimée de façon ubiquitaire, c'est-à-dire qu'elle est présente en permanente dans différents tissus tels que les reins, plaquettes, tube digestif (Smith et al., 1996). Au niveau central, la COX1 est majoritairement exprimée au niveau des cellules du tronc cérébral et de la moelle épinière (Breder et al., 1995). La régulation de la COX1 se fait au niveau de la transcription de son gène sur le chromosome 9. Le gène est composé d'un promoteur sensible à des facteurs de régulation tels que NF-kB, c-Fos, c-jun, krox et ERK (Kang et al., 2007). L'isoforme COX1 est impliquée dans la production de prostaglandines (par exemple TXA₂, PGE₂, PGI₂). Son rôle intervient dans le maintien de l'homéostasie cellulaire en particulier dans la protection de la muqueuse intestinale (son inhibition reviendrait à provoquer des dommages gastriques tels que des hémorragies et ulcérations). La COX1 intervient également dans le maintien du flux plasmatique au niveau des reins et le taux de filtration glomérulaire par le système de vasoconstriction (Jones, 1972), et fournit les précurseurs essentiels à la synthèse des thromboxanes dans le maintien de l'agrégation plaquettaire (Dubois et al., 1998). En présence d'inhibiteurs de COX, notamment les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), les plaquettes ne peuvent plus synthétiser de thromboxanes et sont alors incapables de s'agréger correctement. La toxicité rénale des AINS est également expliquée par l'inhibition de ces COX pouvant entraîner une ischémie rénale (Zambraski, 1995).

2. COX2

La COX2 est une enzyme inductible par un état inflammatoire dont le taux est augmenté au niveau périphérique (reins, endothélium vasculaire et appareils reproducteurs), mais aussi au niveau central : neurones et cellules gliales de l'hippocampe, l'hypothalamus, le cortex, l'amygdale et la moelle épinière (Yamagata et al., 1993; Andreasson et al., 2001). La présence de COX2 est indétectable dans la plupart des tissus normaux, excepté dans le système nerveux central, les reins, le système cardiovasculaire et les vésicules séminales. Le gène précoce de la COX2 est localisé sur le chromosome 1 (Kosaka et al., 1994). Cette enzyme est physiologiquement importante pour le contrôle de l'immunité innée et pour la reproduction chez les femmes, car elle intervient dans le phénomène d'ovulation (Mbonye et Song, 2009). En contexte inflammatoire, son expression est activée par des facteurs pro-inflammatoires et prolifératifs tels que les facteurs de croissance EGF (« *epidermal growth factor* »), le facteur de croissance des plaquettes PDGF (« *platelet-derived growth factor* »), les cytokines pro- inflammatoires comme l'IL-1β, l'IL-2 et le TNFα, les promoteurs de tumeurs, les acides biliaires, les céramides et les radiations UV (Tsatsanis et al., 2006). L'induction de l'expression de la COX2 a pour but de stimuler et maintenir l'état inflammatoire par la production des PGE₂. L'isoenzyme COX2 étant exprimée majoritairement en situation inflammatoire, elle est

devenue une cible privilégiée dans le traitement de l'inflammation. Le concept d'inhibiteur sélectif de la COX2 est alors né et a conduit rapidement à une nouvelle sous-classe d'AINS : les coxibs (célécoxib, rofécoxib, nimésulide...).

b. Paracétamol et inhibition des COX

Depuis les travaux de Vane (1971) sur les propriétés des AINS comme inhibant l'activité enzymatique des COX, il a été proposé que le paracétamol partage ces mêmes propriétés (Flower et Vane, 1972; Vane et Botting, 1998). Ainsi, plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer le mécanisme moléculaire d'inhibition des COX par le paracétamol :

- Une inhibition de la libération d'acide arachidonique des membranes cellulaires.
- Une compétition entre le paracétamol et l'acide arachidonique sur le site actif de la COX.
- Un effet inhibiteur d'un produit de dégradation du paracétamol le NAPQI (N-acétyl-p-benzoquinone imine, Cf. **1^{er} Chap.II.3. Métabolisme et élimination**)

Aucune de ces hypothèses n'a pu être confirmée par le passé. Les mécanismes d'actions du paracétamol impliquant le système cyclooxygénase sont alors basés sur deux autres théories : **la première théorie** est en faveur d'une action directe du paracétamol en inhibant l'activité des COX centrales (Flower et Vane, 1972). Le mécanisme serait un effet réducteur du paracétamol en piégeant les peroxydes, ce qui a pour effet de diminuer la forme oxydée des COX les rendant alors inactives (Hanel et Lands, 1982). **Une deuxième théorie** plus récente met en avant l'effet inhibiteur des COX d'un nouveau métabolite issu du paracétamol : l'AM404 (Högestätt et al., 2005).

Concernant la première théorie, l'ensemble des études *in vitro* dont celle menée par Fower et Vane (1972) tendent à montrer un effet inhibiteur du paracétamol sur l'activité des COX. Ces résultats sont également retrouvés dans d'autres études *ex vivo* (Ferrari et al., 1990; Malmberg et Yaksh, 1994) et *in vivo* (Muth-Selbach et al., 1999; Engström Ruud et al., 2013). Ils confortent l'idée que le paracétamol est un inhibiteur de l'activité de la COX et plus particulièrement au niveau central. Des résultats obtenus au niveau de cellules endothéliales humaines montrent que le paracétamol inhibe l'activité de l'isoforme COX2 avec un EC₅₀ de 66 µM, proche des concentrations retrouvées en clinique (Boutaud et al., 2002). Il semblerait que le paracétamol ait une sélectivité 4 fois supérieure pour l'inhibition de la COX2 (Hinz et Brune, 2012). Une inhibition de la formation de PGE₂ chez l'homme après une dose thérapeutique de 1 g de paracétamol est également retrouvée au niveau de l'inflammation induite par une extraction chirurgicale d'une molaire (Lee et al., 2007).

A contrario, des études mesurant l'impact du paracétamol sur des extraits de COX purifiées, ou sur homogénats cellulaires, montrent un effet plutôt stimulateur de la production des PGE₂ pour de faibles doses de paracétamol. En effet, l'inhibition des COX par le paracétamol nécessiterait de plus fortes doses (>1 mM), largement considérées comme toxiques (Robak et al., 1978; Harvison et al., 1988; Swierkosz et al., 2002). Graham et al. (2005) explique que le paracétamol est un « mauvais » inhibiteur de l'activité cyclooxygénase en condition inflammatoire. Cet effet inhibiteur n'est en réalité retrouvé que dans les études *in vitro* avec des cellules intactes et un faible taux d'acide arachidonique. Cette idée est confirmée par les articles de Clissold et al. (1986) et Warner et al. (1999), montrant que le paracétamol n'a pas les propriétés anti-inflammatoires équivalentes aux AINS. Un effet anti-inflammatoire du paracétamol n'a pas été retrouvé dans d'autres études sur les modèles animaux d'inflammation (al-Swayeh et al., 2000; Alloui et al., 2002) ou chez l'homme (Ring et al., 1974). Mais, partant du constat que le paracétamol avait une action inhibitrice différente en fonction du tissu étudié, une nouvelle hypothèse est alors soulevée avec l'implication d'une nouvelle isoforme de la COX : la COX3 (Botting, 2000; Botting et Ayoub, 2005). Cette nouvelle isoforme de la COX ne serait qu'une variante de la COX1 et se retrouverait au niveau du tissu nerveux central chez le chien, la souris ou encore le rat. Elle serait la cible d'action, outre du paracétamol, des pyrazoles (Chandrasekharan et al., 2002; Shaftel et al., 2003). Cette enzyme serait le produit d'un épissage alternatif de l'ARNm de la COX1 dont l'intron 1 (90 nucléotides chez le chien) est maintenu. En raison de sa proximité génétique avec la COX1, certains auteurs rejettent le nom de COX3 et préfèrent à cela le nom de COX1b (Davies et al., 2004; Snipes et al., 2005). Cette théorie est maintenant obsolète puisqu'il a été démontré que cette isoforme présente une protéine fonctionnelle uniquement chez certaines espèces canines (Chandrasekharan et al., 2002; Crawley et al., 2008). Une forme active de l'enzyme COX3 demeure incertaine (Warner et Mitchell, 2004), puisqu'elle serait non fonctionnellement. En effet, les travaux de Dinchuk et al. (2003) montrent que parmi sur les 24 clones d'ADNc de COX1 extraits de cortex humain, seul 7 possèdent l'intron 1, mais avec une taille de 94 nucléotides. Ce défaut de nucléotide a pour effet d'introduire un décalage dans le cadre de lecture lors de la transcription. Il se forme alors une protéine tronquée inactive. Le même phénomène est retrouvé chez le rat et la souris avec la rétention d'un intro de 98 pb provoquant également un décalage de lecture et par conséquent la formation d'une protéine différente (Kis et al., 2003; Warner et al., 2004). L'effet du paracétamol sur les COX est sujet à controverse. Il a été pourtant montré que le paracétamol n'inhibe que modestement ces COX.

Suivant cette première théorie, **le mécanisme du paracétamol impliquerait un effet réducteur de celui-ci en piégeant les peroxydes**, ce qui aurait pour effet de diminuer la forme oxydée des COX les rendant alors inactives. Cette hypothèse a été mise en avant pour la première

fois par Hanel et Lands (1982). En effet, les COX sont des enzymes composées de deux sites actifs (**Figure 26**) : un site capable dans un premier temps de catalyser des réactions de dioxygénation de l'acide arachidonique en PGG₂ (site cyclooxygénase), puis dans un deuxième temps un site peroxydase catalysant des réactions de réduction de la PGG₂ instable en PGH₂ (précurseur entre autres des PGE₂). Cette dernière réaction réductrice des COX permet également à l'enzyme de revenir à son état de repos. Dans cet ensemble de réactions, l'hypothèse est que le paracétamol réduirait la forme oxydée des COX empêchant ainsi l'activité peroxydase et la formation de l'intermédiaire PGH₂ (Ouellet et Percival, 2001; Aronoff et al., 2006; Anderson, 2008). Plus récemment, il a été démontré que parmi les endopéroxydes capables de régénérer les COX oxydées par l'activité cyclooxygénase, les peroxy-nitrites étaient particulièrement importants (Schildknecht et al., 2005). Il a été aussi montré que le paracétamol était un puissant piègeur de ces peroxy-nitrites bloquant ainsi la réduction de la forme oxydée de la COX et la formation de PGH₂ (Schildknecht et al., 2008).

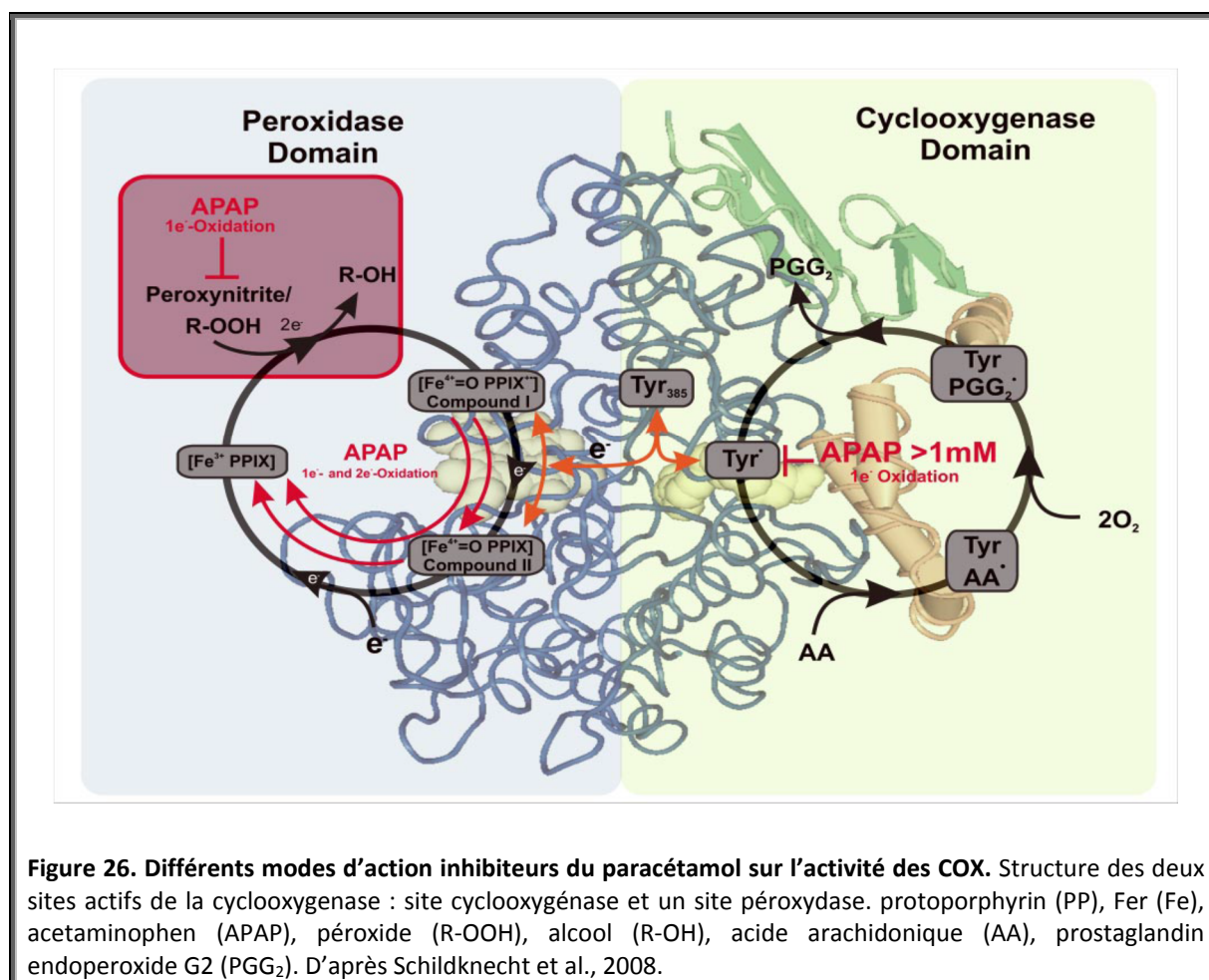


Figure 26. Différents modes d'action inhibiteurs du paracétamol sur l'activité des COX. Structure des deux sites actifs de la cyclooxygénase : site cyclooxygénase et un site peroxydase. protoporphyrin (PP), Fer (Fe), acetaminophen (APAP), peroxyde (R-OOH), alcool (R-OH), acide arachidonique (AA), prostaglandin endoperoxyde G₂ (PGG₂). D'après Schildknecht et al., 2008.

Une deuxième théorie, plus récente, repose sur l'activité inhibitrice de l'AM404, un produit de la métabolisation du paracétamol sur les COX (**Högestätt et al., 2005, Cf. 2^{ème} Chap.II.3.c. L'AM404 : une action inhibitrice sur les COX1 / COX2**). En effet, cette hypothèse est assez séduisante, car ce métabolite du paracétamol est principalement formé au niveau central. Or, l'action inhibitrice des COX par le paracétamol suggère également une action centrale, ce qui conforterait que l'activité inhibitrice du paracétamol *via* l'AM404 sur les COX soit majoritairement central. Cependant, cette théorie n'a actuellement pas été confirmée par d'autres études.

2. Autres hypothèses mécanistiques

a. Paracétamol et système opioïdérique

Une étude de microdialyse spinale a mis en évidence que l'administration intracérébroventriculaire de morphine était suivie d'une augmentation de la libération de 5-HT médullaire (Jung et al., 1994). De même, une étude a montré une augmentation centrale de 5-HT après administration de paracétamol (Pini et al., 1996). De plus, l'effet antalgique de la morphine et du paracétamol est altéré lors d'une déplétion des stocks de 5-HT (Berge et al., 1983; Tjølsen et al., 1991; Pini et al., 1996; Dogrul et al., 2012a) ou le blocage de récepteurs sérotoninergiques (Kawamata et al., 2002; Bonnefont et al., 2005; Dogrul et al., 2012a). L'ensemble de ces arguments peut amener à se poser la question d'un mécanisme central similaire entre la morphine et le paracétamol, avec un recrutement des voies sérotoninergiques descendantes modulatrices de la douleur.

Des études chez l'animal montrent que l'administration d'un antagoniste des récepteurs μ à la morphine (la naloxone) diminue l'effet antalgique du paracétamol (Pini et al., 1997). Ces auteurs ont alors proposé que le paracétamol puisse directement se fixer sur les récepteurs opioïdes de type μ mais cette possibilité a été infirmée (Pelissier et al., 1996; Raffa et Codd, 1996). Cette hypothèse est remise en cause par des articles ne retrouvant pas la perte d'efficacité antalgique du paracétamol après administration de naloxone (Pelissier et al., 1996; Madenoğlu et al., 2010). Une étude clinique menée sur 12 volontaires sains a également étudié l'impact d'une co-administration de naloxone (8 mg, i.v.) avec le paracétamol (1 g, i.v.). Les résultats montrent qu'un antagoniste opioïdérique ne modifie pas le potentiel analgésique du paracétamol (Pickering et al., 2013).

Ces données ne permettent pas d'écarter la possibilité que le paracétamol et les opioïdes puissent mobiliser un même système par des mécanismes distincts (Raffa et al., 2004). En effet, une autre étude montre qu'une administration répétée de paracétamol et de morphine peut indépendamment réduire le nombre de récepteurs μ au niveau du cortex préfrontal. Les données

indiquent également que parallèlement à cette diminution des récepteurs μ , la morphine perd son efficacité analgésique tandis que le paracétamol conserve son potentiel antalgique (après des administrations répétées). Ces résultats suggéreraient que le paracétamol ferait intervenir d'autres récepteurs centraux que les récepteurs μ , mais recruterait le même système que la morphine dans le renforcement des contrôles sérotoninergiques descendants.

b. Paracétamol et récepteurs à l'Adénosine A1/A2

L'adénosine est une substance endogène du SNC notamment impliquée dans la modulation de la neurotransmission de fonctions physiologiques telles que la régulation de l'éveil et du sommeil, mais aussi l'anxiété, la cognition et la mémoire, le système cardiovasculaire... (Latini et Pedata, 2001; Sheth et al., 2014). Il existe 3 sous-types de récepteurs A1, A2 (A_{2A} et A_{2B}) et A₃. Le sous-type A₁ est particulièrement impliqué dans la douleur et les processus de modulation de la douleur. Le récepteur A₁ est un RCPG couplé à une protéine G_i inhibitrice, exprimé au niveau des couches superficielles médullaires (Sawynok et Liu, 2003). Sa localisation post-synaptique lui confère un rôle dans l'inhibition de l'influ nerveux par l'ouverture de canaux K⁺ suivie d'une hyperpolarisation (Patel et al., 2001). Une activation des récepteurs A₁ spinaux revient à une inhibition de la libération de CGRP (« *calcitonin gene-related peptide* ») provenant des FAPs porteuses du message nociceptif (Mauborgne et al., 2002).

Tableau 9. Résumé des effets centraux des récepteurs à l'adénosine A₁ et A_{2A} et de leurs fonctions au niveau médullaire. Dorsal root ganglion (DRG), calcitonin gene related peptide (CGRP). D'après Sawynok et Liu, 2003.

Récepteur	Site	Effet
A ₁	Chez l'animal (<i>in vivo</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de la douleur • Diminution du courant Ca²⁺ dans les neurones des DRG
	Corne dorsale de la moelle épinière (pré-synaptique)	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de la libération de CGRP • Hyperpolarisation des neurones médullaires • Activation des canaux K⁺
	Corne latérale de la moelle épinière (post-synaptique)	<ul style="list-style-type: none"> • Régulation du système sympathique • Inhibition des afférences provenant des centres supérieurs
A _{2A}	Chez l'animal (<i>in vivo</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Implication incertaine dans la douleur • Effet neuroprotecteur suite à un(e) trauma /ischémie
	Corne ventrale de la moelle épinière	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de son expression après ischémie spinale

L'implication potentielle du système adénosine dans le mécanisme d'action du paracétamol a été mise en avant par l'utilisation de la caféine comme adjuvant dans certaines formulations du paracétamol. En effet, la caféine est un antagoniste non sélectif des récepteurs A_1 , A_{2A} et A_{2B} et a une faible activité sur les récepteurs A_3 . La caféine peut avoir intrinsèquement des propriétés pro- ou antinociceptives dépendamment des doses utilisées. Son effet propre antinociceptif peut être attribué au blocage des récepteurs A_{2A} et A_{2B} (Sawynok, 2011a; Tavares et Sakata, 2012). Son utilisation comme adjuvant en association avec le paracétamol est débattue puisque certains auteurs avancent que la caféine n'améliore que très peu l'effet antalgique du paracétamol. D'autres études expliquent que la caféine, au contraire, amplifie et prolonge l'action du paracétamol avec une accélération de son absorption (Renner et al., 2007; Sawynok, 2011a; Tavares et Sakata, 2012). La corrélation entre le système adénosine et le paracétamol provient d'une étude chez l'animal montrant qu'une faible dose de caféine (10 mg/kg) peut altérer l'effet antalgique du paracétamol (Godfrey et al., 2006). Au contraire, des doses supérieures de caféine comprises entre 50 et 100 mg/kg améliorent l'effet du paracétamol (Siegers, 1973). Les résultats obtenus dans l'étude de Godfrey et al. (2006) montrent que l'inhibition de l'effet antinociceptif du paracétamol par la caféine serait dépendante des récepteurs A_1 spinaux ou supra-spinaux (Godfrey et al., 2006), n'excluant pas l'implication des récepteurs A_2 dans le mécanisme d'action antalgique du paracétamol. L'effet potentialisateur de la caféine à plus forte dose couplée au paracétamol résiderait dans l'effet antinociceptif de la caféine sur les récepteurs A_{2A} et A_{2B} qui s'ajouterait à l'effet antinociceptif du paracétamol *via* les récepteurs A_1 (Godfrey et al., 2006; Sawynok, 2011b; Sawynok and Reid, 2012). L'équipe de Sawynok et Reid (2012) s'est intéressée aux interactions du paracétamol avec le système adénosine. Leurs études confirment que le récepteur A_1 est impliqué au niveau spinal dans l'effet antinociceptif du paracétamol. Chez les souris $A_1^{-/-}$, le paracétamol conserve un effet antinociceptif, en revanche la caféine perd sa capacité à bloquer l'effet antalgique du paracétamol. Ces résultats particulièrement intéressants montrent que le mécanisme antalgique du paracétamol n'interagit pas directement avec les récepteurs A_1 . En contrepartie, la caféine nécessite la présence de ces récepteurs A_1 pour inhiber l'effet du paracétamol. L'implication des récepteurs A_1 dans le mécanisme d'action antalgique du paracétamol serait secondaire.

Une étroite relation entre les récepteurs A_1 et 5-HT_7 existerait vis-à-vis du mécanisme d'action antalgique du paracétamol (Sawynok et Reid, 2012; Liu et al., 2013). En effet, l'analgésie au paracétamol (300 mg/kg, i.p.) est inhibée par une administration médullaire d'un antagoniste 5-HT_7 (SB269970, 3 μg) et cette inhibition n'est pas retrouvée chez les souris $A_1^{-/-}$ (Dogrul et al., 2012a; Liu et al., 2013). Il y aurait donc un lien fonctionnel entre les récepteurs $A_1/5\text{-HT}_7$ au niveau spinal et le mécanisme d'action antalgique du paracétamol *via* le renforcement des voies descendantes.

c. Paracétamol et système cholinergique

Le système cholinergique est impliqué dans la modulation de la douleur avec un rôle prépondérant au niveau spinal. La libération médullaire d'acétylcholine faisant suite à un *stimulus* douloureux provient généralement d'une activation des voies descendantes adrénérgiques (Jones et Dunlop, 2007). L'acétylcholine limite ainsi le relargage du neurotransmetteur exciteur (glutamate) au niveau spinal et freine la propagation du message nociceptif (Li et al., 2002). Il est possible de mimer la libération médullaire d'acétylcholine par l'administration d'agents cholinergiques ou d'inhibiteurs de l'enzyme de dégradation acétylcholinestérase, pour induire un effet antinociceptif (Jones et Dunlop, 2007). Il a également été montré que certains agents pharmacologiques tels que la morphine, la clonidine et la dexmedetomidine peuvent provoquer une libération spinale d'acétylcholine (De Kock et al., 1997; Chen et Pan, 2001; Kimura et al., 2012).

Une preuve indirecte d'une corrélation entre l'effet antinociceptif du paracétamol et l'implication du système cholinergique est proposée par Miranda et al. (2002). Une évaluation isobologique de l'efficacité antinociceptive de la co-administration systémique de paracétamol et d'un inhibiteur de l'acétylcholinestérase (néostigmine), montre un effet synergique. Cependant, lorsque le paracétamol est administré au niveau médullaire (i.t), l'association avec la néostigmine systémique (i.p.) se limite à un effet additif. L'interprétation faite de ces résultats est une coopération supra-spinale entre le paracétamol et le système cholinergique. Le postulat d'un effet antinociceptif supra-spinal de la néostigmine *via* une stimulation des contrôles descendants s'associerait à l'effet cérébral du paracétamol lors de son administration systémique. Cependant, une injection localisée au niveau médullaire ne permet pas une diffusion jusqu'au centre supérieur, ce qui expliquerait l'absence d'effet synergique. Cette hypothèse est cohérente avec les données d'une autre étude sur l'inhibition de l'effet antinociceptif du paracétamol lors d'une déplétion des stocks cérébraux d'acétylcholine par l'hémicholinium-3 (5 µg, i.c.v.) ou l'injection systémique d'un antagoniste muscarinique (atropine, 1 mg/kg i.p., Pinardi et al., 2003). L'équipe d'Abelson et al. (2004) a étudié l'impact d'une administration systémique de paracétamol (300 mg/kg, s.c.) sur les taux d'acétylcholine médullaire par microdialyse spinale. Dix minutes après traitement, il y a une diminution du relargage d'acétylcholine au niveau spinal qui perdure plus de 1h30. La diffusion directement au niveau spinal de paracétamol n'a par contre aucun effet sur l'acétylcholine. Cette étude conclut que le paracétamol n'interagit pas directement sur le système cholinergique au niveau médullaire, en favorisant l'hypothèse d'une implication supra-spinale avec d'autres systèmes (système sérotoninergique ou adrénérgique, Cf. 3^{ème} Chap.II.e. **Système cholinergique**).

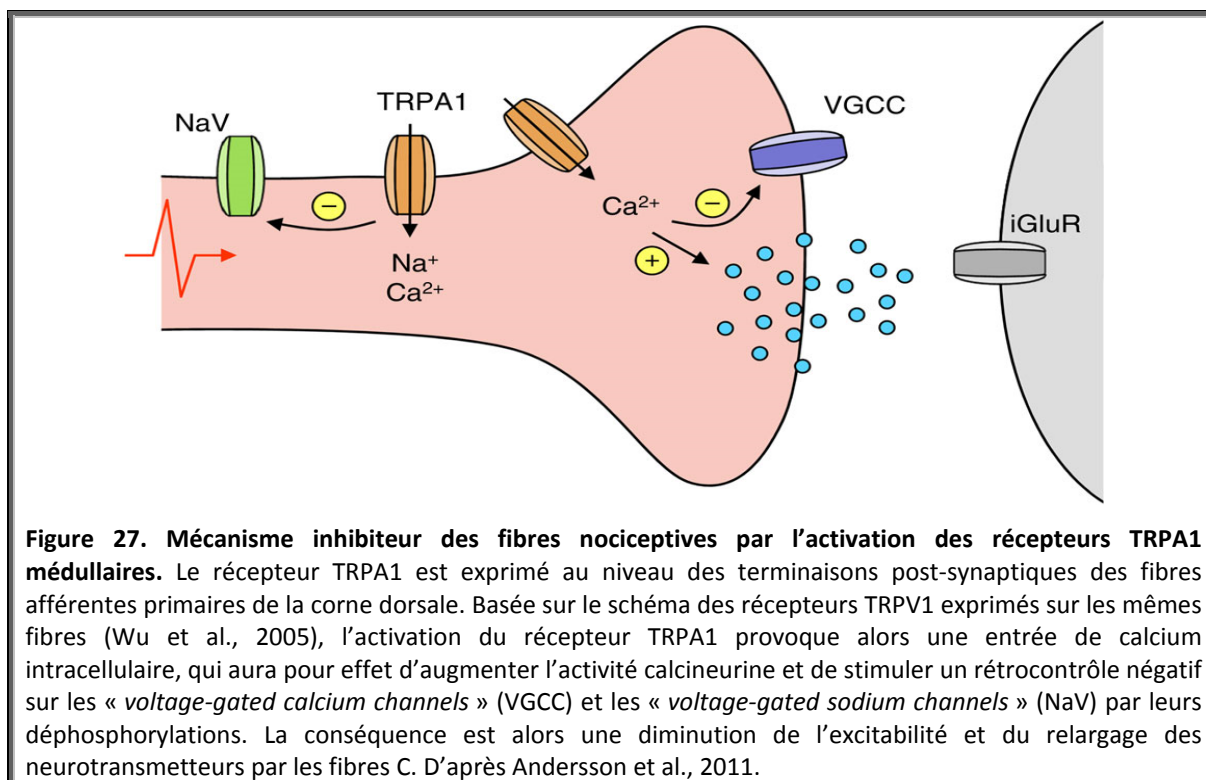
d. Implication du métabolite NAPQI sur du récepteur TRPA1

Le NAPQI (N-acétyl-p-benzoquinone imine) est un composé électrolytique issu de la métabolisation du paracétamol par les cytochromes P450 (Cf. 1^{er} Chap.II.3. Métabolisme et élimination).

Le récepteur TRPA1 est un thermosenseur de la douleur au froid exprimé dans le soma des fibres C et probablement des fibres A δ des neurones sensoriels du DRG. Ce récepteur est impliqué dans les processus inflammatoires, avec une augmentation de son expression et une contribution à entretenir l'hypersensibilité (Andrade et al., 2012).

Un récent article publié par Andersson et al., (2011) propose une nouvelle hypothèse concernant le mécanisme d'action antalgique du paracétamol. Le NAPQI formé *in situ* et issu du métabolisme du paracétamol, activerait les récepteurs TRPA1 médullaires pour induire un effet antinociceptif. Les résultats présentés dans l'article montrent qu'une activation spinale du récepteur TRPA1 produit un effet antinociceptif. Le paracétamol n'a pas d'activité propre sur ce récepteur, mais son métabolite NAPQI peut induire une activation robuste du récepteur TRPA1. En effet, 30 et 60 minutes après administration systémique de paracétamol (300 mg/kg, s.c.), il est possible de quantifier la forme stabilisée du NAPQI (L-cysteinyl-S-paracétamol). Il y aurait donc un métabolisme médullaire du paracétamol pour former ce réactif intermédiaire NAPQI. Si ce dernier est directement injecté par voie i.t., il produit un effet antinociceptif qui n'est pas retrouvé chez les souris TRPA1^{-/-}. Il serait possible que du NAPQI soit formé suite à l'administration de paracétamol, conduisant à l'activation de récepteur TRPA1 médullaire pour induire un effet antinociceptif.

Le mécanisme supposé qui résulte de l'activation spinale des récepteurs TRPA1 repose sur une augmentation de l'influx calcique, ce qui produirait une dépolarisation puis une inhibition des canaux calciques et sodiques voltages-dépendants, donc une diminution de l'activation des fibres C post-synaptiques par la diminution pré-synaptique de la libération de neurotransmetteurs excitateurs (**Figure 27**, Andersson et al., 2011). L'ensemble de ces données plaide en faveur d'une implication des récepteurs TRPA1 spinaux dans l'effet antinociceptif du paracétamol *via* la formation médullaire de NAPQI.



Cependant, cette hypothèse reste très peu étudiée et contestable. Les résultats présentés dans l'article d'Andersson et al. (2011) ne montrent pas de lien direct entre une prise systémique de paracétamol et une activation des récepteurs TRPA1 spinaux. En effet, une injection i.t. d'un inhibiteur spécifique des récepteurs TRPA1 (ex : HC-030031) aurait permis de confirmer le rôle des récepteurs TRPA1 dans le mécanisme antalgique du paracétamol. Il faut également noter que, certains articles relatent un effet pronociceptif dû à l'activation des récepteurs TRPA1 médullaires (Klafke et al., 2012; Wei et al., 2013). Il est d'autant plus surprenant que plusieurs travaux ont tendance à étudier le potentielle antinociceptif des antagonistes TRPA1 administrés au niveau spinal (Miyakawa et al., 2014; Zhang et al., 2014).

V. *Résumé du mécanisme d'action antalgique du paracétamol proposée : Effet central et régions supra-spinales impliquées ?*

Le résumé de l'état actuel des connaissances du mécanisme d'action antalgique du paracétamol nous permet de proposer le schéma mécanistique présenté dans la **Figure 28**. L'évolution des recherches concernant le mécanisme d'action du paracétamol a permis de redéfinir cet antalgique :

- Le paracétamol répond à la **définition d'un promédicament : précurseur** dont l'effet antinociceptif dépend de **sa métabolisation** conduisant à la formation de **son principe actif** au niveau cérébrale : l'AM404 (Högestätt et al., 2005; Mallet et al., 2008, 2010; Barrière et al., 2013a).
- Ce métabolite actif AM404 est un **lipoaminoacide aux propriétés antinociceptives au niveau cérébral** (Mallet et al., 2010).
- L'action antinociceptive du paracétamol implique **une action centrale** dépend de **plusieurs cibles** : le récepteur TRPV1, le récepteur CB1 et le canal Cav3.2 (Mallet et al., 2008, 2010; Kerckhove et al., 2014).
- La finalité du mécanisme antinociceptif du paracétamol est un renforcement des voies descendantes sérotoninergiques modulant la douleur (Mallet et al., 2008, 2012; Dogrul et al., 2012a).

Toutes ces expérimentations nous permettent de discriminer un effet périphérique d'un effet central **sans vraiment localiser la ou les régions cérébrales impliquées**. Plusieurs structures impliquées dans la modulation de la douleur par les voies descendantes sérotoninergiques pourraient être de bons candidats. Parmi ces noyaux cérébraux de l'axe bulbo-spinal, **la SGPA** est un noyau clé qui **rassemble tous les critères** pour être une cible privilégiée du paracétamol, car :

- Elle exprime l'enzyme FAAH, **essentielle pour la formation *in situ* de l'AM404** issue du p-aminophénol.
- Elle exprime également les récepteurs clés comme **le récepteur TRPV1, le récepteur CB1 et le canal Cav3.2**.
- Elle est à même de **produire un effet antinociceptif** suite à l'activation de l'un de ces différents acteurs précédemment évoqués (TRPV1 et CB1).
- L'effet antinociceptif qui résulte de l'activation du récepteur TRPV1 et/ou CB1 dans la SGPA **recrute les contrôles descendants sérotoninergiques**

Ainsi, nous nous focaliseront sur **le rôle de la SGPA dans le mécanisme antalgique du paracétamol**.

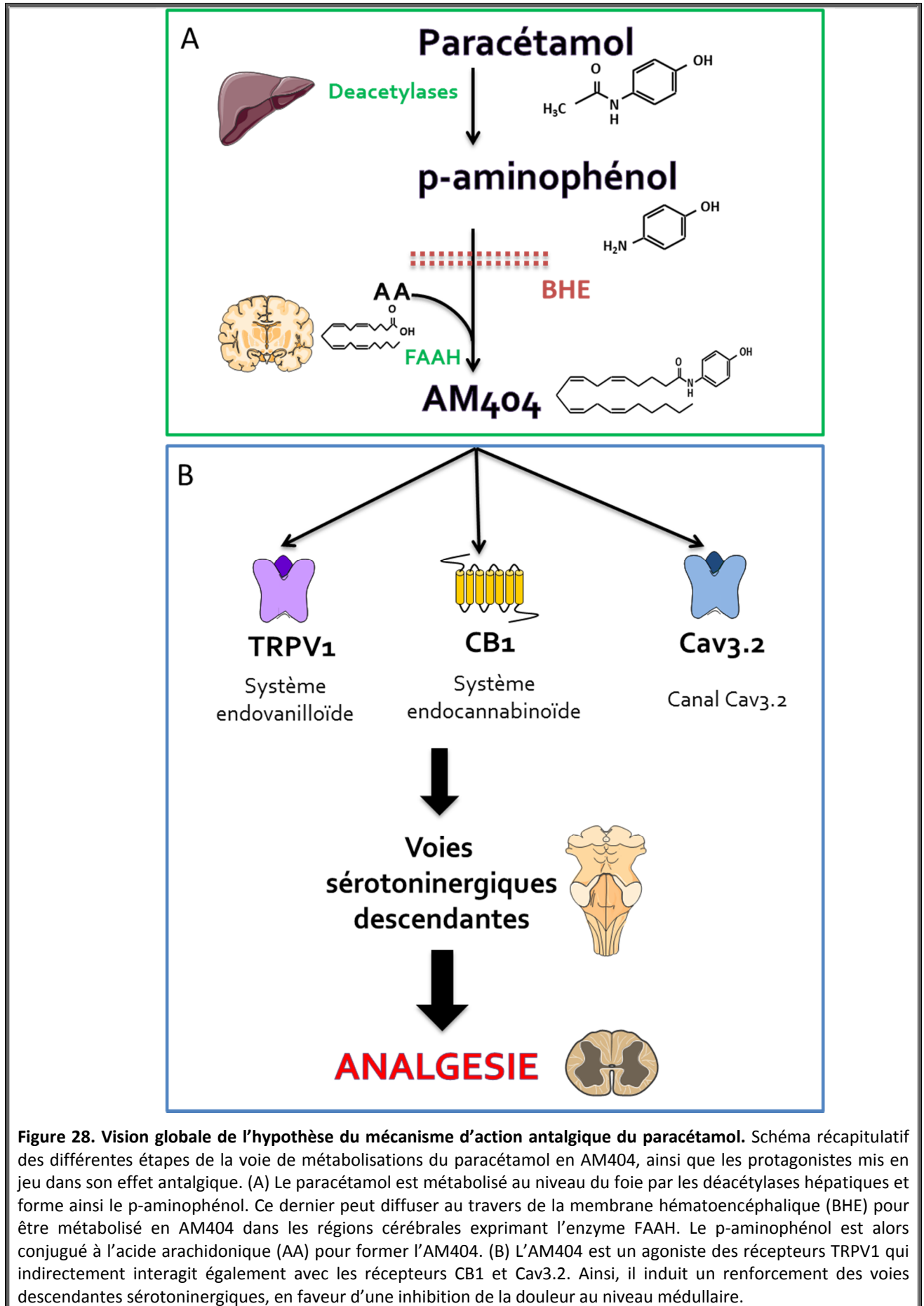


Figure 28. Vision globale de l'hypothèse du mécanisme d'action antalgique du paracétamol. Schéma récapitulatif des différentes étapes de la voie de métabolisations du paracétamol en AM404, ainsi que les protagonistes mis en jeu dans son effet antalgique. (A) Le paracétamol est métabolisé au niveau du foie par les déacétylases hépatiques et forme ainsi le p-aminophénol. Ce dernier peut diffuser au travers de la membrane hématoencéphalique (BHE) pour être métabolisé en AM404 dans les régions cérébrales exprimant l'enzyme FAAH. Le p-aminophénol est alors conjugué à l'acide arachidonique (AA) pour former l'AM404. (B) L'AM404 est un agoniste des récepteurs TRPV1 qui indirectement interagit également avec les récepteurs CB1 et Cav3.2. Ainsi, il induit un renforcement des voies descendantes sérotoninergiques, en faveur d'une inhibition de la douleur au niveau médullaire.

TROISIÈME CHAPITRE
LA SUBSTANCE GRISE
PÉRIAQUEDUCALE :
CENTRE DE MODULATION DE LA
DOULEUR ET IMPLICATION DANS
L'EFFET ANTINOCICEPTIF DU
PARACÉTAMOL ?

1. La substance grise périaqueducale : un noyau central dans la modulation de la douleur

1. Anatomie de la substance grise périaqueducale

La substance grise périaqueducale (SGPA) est une région du mésencéphale dense en cellules, qui entoure l'aqueduc de Sylvius. Elle se positionne au-dessus du tronc cérébral, juste après le cervelet (**Figure 29**). Sa localisation est dans la continuité de la substance grise périventriculaire et se situe au niveau rostral du 3^{ème} ventricule, et au niveau caudal du 4^{ème} ventricule (aqueduc). La pointe de la SGPA débute à la commissure postérieure et finit au niveau du locus coeruleus. La SGPA est retrouvée chez tous les mammifères. Son organisation structurelle est identique entre le lapin, le chat, le singe, le rat et l'homme (Mai and Paxinos, 2011; Paxinos, 2014). Sa position centrale en fait un carrefour entre les informations sensorielles ascendantes et les processus de modulation descendants. Chez l'homme, elle mesure environ 14 mm de longueur et 4 à 5 mm de largeur (Linnman et al., 2011).

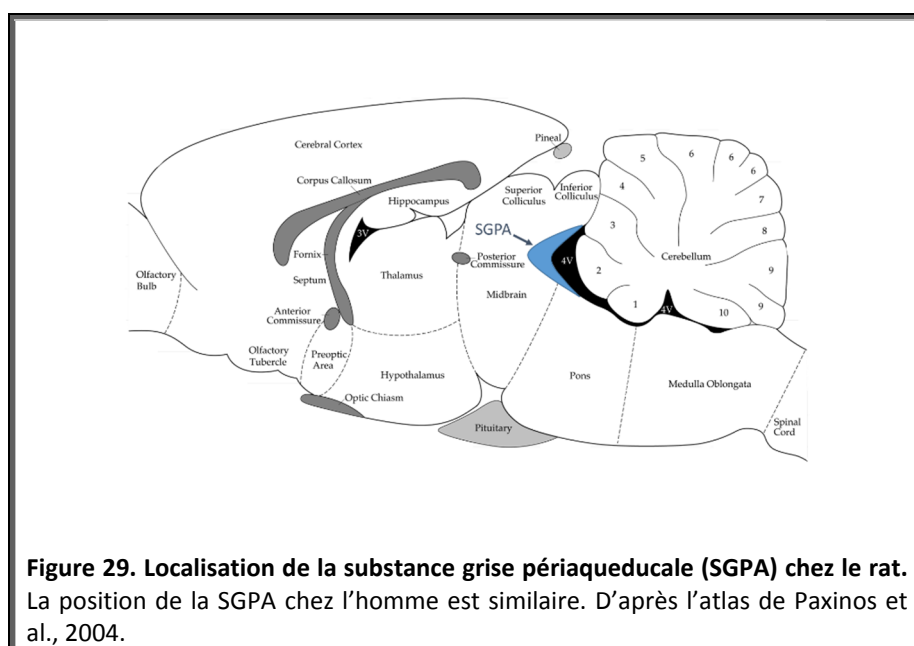
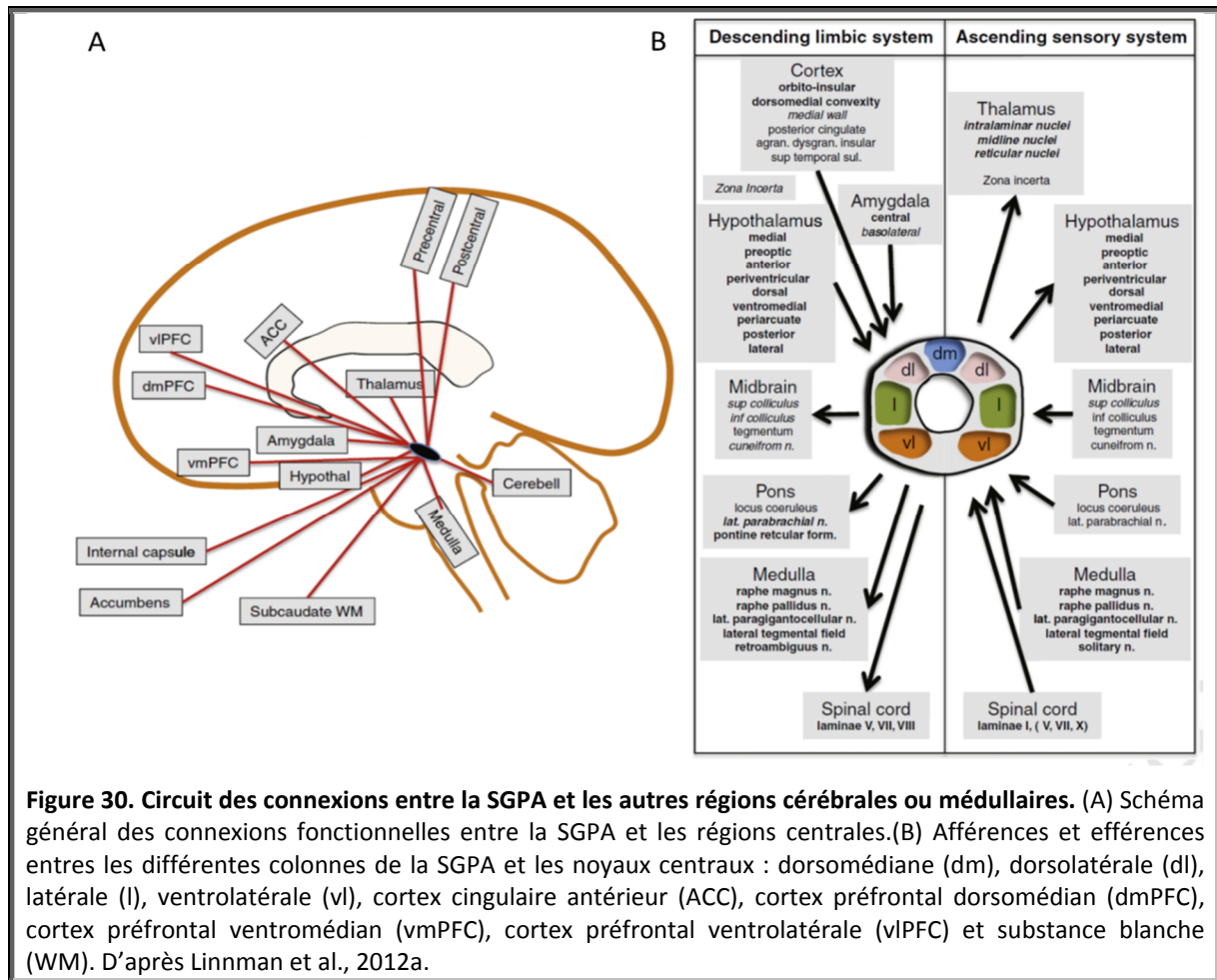


Figure 29. Localisation de la substance grise périaqueducale (SGPA) chez le rat. La position de la SGPA chez l'homme est similaire. D'après l'atlas de Paxinos et al., 2004.

La SGPA est divisible radialement en plusieurs colonnes longitudinales orientées rostrocaudalement (**Figure 30**). Chacune des colonnes est nommée en fonction de sa position par rapport à l'aqueduc : dorsomédiane (dm-SGPA), dorsolatérale (dl-SGPA), latérale (l-SGPA) et ventrolatérale (vl-SGPA). Cette organisation a été proposée par Carrive et Bandler (1991) sur la base des connexions structurelles et fonctionnelles de la SGPA. Une autre organisation structurelle, plus rarement employée, est basée sur la distribution neurochimique de l'enzyme NADPH-diaphorase (Mai and Paxinos, 2011; Paxinos, 2014).

LA SUBSTANCE GRISE PÉRIQUADUCALE : CENTRE DE MODULATION DE LA DOULEUR ET IMPLICATION DANS L'EFFET ANTINOCICEPTIF DU PARACÉTAMOL ?

Nous détaillerons les connexions structurelles et fonctionnelles de la SGPA. Ces colonnes reçoivent différentes **afférences** projetant sur d'autres structures (**efférences**). Chacune de ces parties est reliée à différents noyaux pour former un réseau (**Figure 30**).



a. Les afférences

Les afférences proviennent des parties antérieures du cerveau et concernent majoritairement le système limbique ainsi que le cortex préfrontal. Plus précisément, la SGPA reçoit des projections du cortex insulaire/temporal et de l'hypothalamus. Quelques connexions afférentes sont observées avec le thalamus. La vl-SGPA reçoit des projections de la partie centrale de l'amygdale. D'autres connexions annexes moins importantes proviennent des ganglions de la base (noyau accumbens, le *globus pallidus* (Dujardin and Jürgens, 2005; Linnman et al., 2011; Mai and Paxinos, 2011)).

Les afférences issues du tronc cérébral proviennent du *locus coeruleus* et du noyau latéral parabrachial. La vl-SGPA reçoit également des projections de la partie ventromédiane et dorsomédiane du tronc cérébral. La partie médullaire ventrolatérale du tronc cérébral projette en direction de la dm-SGPA, la l-SGPA et la vl-SGPA. La partie mésencéphalique projette également des connexions provenant de l'*olliculus* (supérieur et inférieur), du *tegmentum*, du noyau cunéiforme, de la substance noire et du raphé dorsal (Linnman et al., 2011; Mai and Paxinos, 2011).

Les afférences provenant de la région médullaire sont originaires de la couche superficielle I de la corne dorsale, mais également des couches plus profondes V, VII et X. En général, elles ciblent les parties latérales et ventrolatérales de la SGPA. Les projections issues du trijumeau ciblent la partie rostrale de la l-SGPA et vl-SGPA. Quant aux parties caudales de la l-SGPA et vl-SGPA, elles reçoivent des afférences des zones cervicales et lombaires (Mai et Paxinos, 2011; Linnman et al., 2012a).

b. Les afférences

Des tracés antérogrades ont dévoilé l'origine des afférences provenant des parties antérieures du cerveau. La SGPA projette principalement sur le diencephale (hypothalamus et thalamus). Les projections thalamiques, et plus précisément le noyau paraventriculaire, concernent toutes les sous-colonnes de la SGPA avec une prédominance pour la colonne dorsolatérale. Quant aux colonnes latérales et ventrolatérales, elles sont connectées avec les noyaux intralaminaires et médians du thalamus. En effet, ces noyaux contribuent à la voie paléospinothalamique, qui transmet la douleur lente et diffuse provenant des fibres C jusqu'aux centres limbiques supérieurs. Ainsi, la SGPA peut accéder aux centres supérieurs par le relais thalamique (Mai et Paxinos, 2011; Linnman et al., 2012a).

Les projections de la SGPA sur le tronc cérébral concernent majoritairement la partie mésencéphalique. Les projections sont au niveau du *locus coeruleus* et du noyau latéral parabrachial (Linnman et al., 2011; Mai and Paxinos, 2011).

Les projections médullaires de la SGPA ciblent les couches intermédiaires et profondes de la corne dorsale (V, VII et VIII). La SGPA n'ayant pas de connexion directe avec les couches superficielles de la moelle épinière, elle doit obligatoirement passer par le relais de la RVM (plus particulièrement la partie du raphé magnus). Ces projections sont d'origine latérale à ventrolatérale (Linnman et al., 2011; Mai and Paxinos, 2011).

2. Neurochimie de la substance grise périaqueducale

a. Les monoamines

Les catécholamines sont majoritairement exprimées au niveau des neurones de la colonne dorsale de la SGPA. Des fibres dopaminergiques sont retrouvées dans la zone rostrale de la SGPA tandis que des neurones adrénérgiques et noradrénérgiques sont situés dans la partie caudale. Ces dernières sont interconnectées avec le *locus coeruleus*. Des récepteurs α -2-adrénérgiques sont également retrouvés au niveau de la vl-SGPA. Ceci souligne la présence des voies descendantes adrénérgiques impliquées dans la modulation de la douleur. Des récepteurs muscariniques et nicotiniques sont retrouvés au niveau de la dl-SGPA (Mai et Paxinos, 2011).

La sérotonine est présente au niveau des parties latérales et ventrolatérales de la SGPA, ainsi que les récepteurs 5-HT_{1A,B,D,F} et 5-HT_{2A,C}. Les récepteurs 5-HT_{1B,D} sont positionnés au niveau pré-synaptique. Les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{2A,C} sont à la fois pré- et post-synaptiques.

L'ensemble de ces monoamines peut ainsi participer à la modulation de la transmission synaptique (Jeong et al., 2013).

b. Les aminoacides

Les deux aminoacides excitateurs glutamate et aspartate, ainsi que les aminoacides inhibiteurs GABA et glycine, sont retrouvés dans toutes les colonnes de la SGPA. De nombreux récepteurs mGLU et GABA sont également exprimés (Wilson-Poe et al., 2013, 2014; Palazzo et al., 2014).

c. Les neuropeptides

Parmi les nombreux neuropeptides retrouvés dans la SGPA, il y a les enképhalines, les dynorphines et les endorphines. Des fibres enképhalinérgiques sont d'ailleurs retrouvées au niveau des colonnes dorsomédianes, latérales et ventrolatérales de la SGPA. Ces fibres proviennent principalement de l'hypothalamus. La SGPA exprime de nombreux récepteurs aux opioïdes, dont les récepteurs μ et κ (Mai AMD Paxinos, 2011; Wilson-Poe et al., 2012; Bodnar, 2013).

D'autres neuropeptides sont retrouvés comme la substance P en grande quantité dans la dl-SGPA, mais aussi la neurotensine, le CGRP, la somatostatine... (Mai et Paxinos, 2011).

d. Les endocannabinoïdes

Les endocannabinoïdes sont déterminants dans la SGPA puisqu'ils interviennent dans de nombreux processus physiologiques comme le stress ou l'analgésie. Les endocannabinoïdes les plus

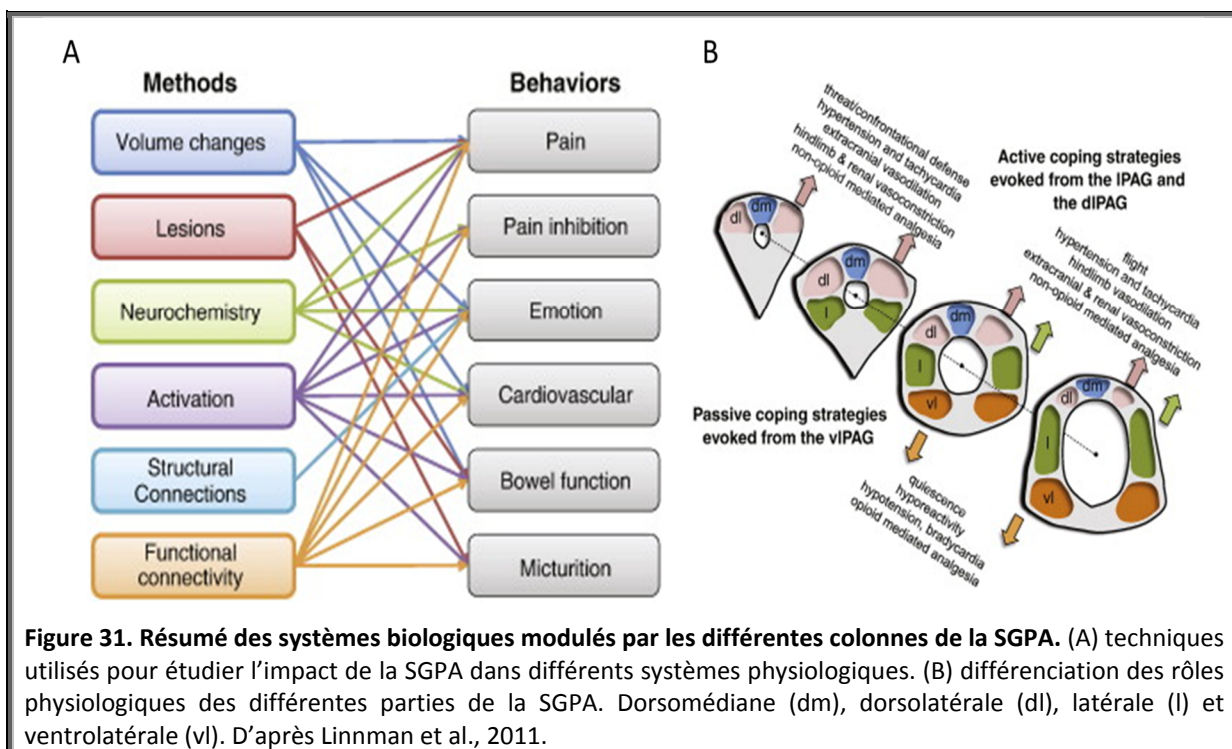
représentés à ce niveau sont le 2-AG et l'AEA. Le stress induit une augmentation des taux de ces d'endocannabinoïdes dans la SGPA (Hohmann et al., 2005). Les récepteurs CB1 sont également exprimés au niveau de la SGPA (Casarotto et al., 2011).

La SGPA est une région avec une grande diversité d'expression d'agents neurochimiques impliqués dans différentes fonctions physiologiques que nous allons étudier. L'implication dans la douleur de ces composés neurochimiques présentés précédemment sera également abordée.

3. Rôles physiologiques

Pour comprendre le rôle d'une région cérébrale, plusieurs stratégies peuvent être employées. Une stimulation électrique ou l'injection d'acides aminés excitateurs sont utilisées afin d'évaluer les répercussions de l'activation de certains noyaux cérébraux. Une lésion mécanique, chimique ou thermique, est une autre possibilité pour comprendre l'impact de la perte de fonctionnalité de la zone ciblée. Ainsi, grâce à plusieurs de ces techniques (**Figure 31A**) des rôles fonctionnels distincts ont été découverts pour chacun des sous-noyaux de la SGPA (**Figure 31B**). Entre autres, la partie dorsale de la SGPA se révèle être impliquée dans les phénomènes de stress et des comportements défensifs, avec toutes les adaptations physiologiques que cela engendre. La stimulation de la partie plus ventrale de la SGPA, quant à elle, entraîne une diminution de l'activité (comportement passif) et une hyporéactivité et une diminution de la sensibilité à la douleur (Mai et Paxinos, 2011).

Dans les paragraphes suivants, nous étudierons plus en détail les différentes fonctionnalités de la SGPA.



a. Fonction cardiaque et vasculaire

La SGPA peut interagir avec le rythme cardiaque et la pression artérielle, comme une réponse adaptative face à une situation de stress. Une étude clinique menée par l'équipe de Green et al. (2005) montre qu'une stimulation électrique profonde de la partie ventrale de la SGPA effectuée sur 15 patients conduit à une diminution de la pression systolique chez 7 d'entre eux. La stimulation de la zone dorsale de la SGPA induit quant à elle une augmentation de la pression systolique chez 6 de ces patients. L'utilité de ces stimulations profondes pour prévenir les chutes brutales de la pression artérielle dans les cas d'hypotension orthostatique a été démontrée, suggérant par la même occasion que la stimulation de la zone ventrale de SGPA serait une piste dans le traitement des hypertensions (Green et al., 2006a, 2007). Des effets cardiaques sont également décrits. Une stimulation de la partie dorsale de la SGPA conduit à une tachycardie, tandis que la stimulation de la vl-SGPA provoque une bradycardie (Linnman et al., 2011). La SGPA aurait donc un rôle cardiaque et vasculaire important en modulant l'activité du système sympathique (Johnson et al., 2004; Green et al., 2006a, 2006b; Dampney et al., 2013).

b. Anxiété et comportement défensif

La SGPA participe à une modulation comportementale et émotionnelle. Une expérimentation étudiant l'impact d'une activation de la SGPA par micro-injection d'acides aminés excitateurs (glutamate, aspartate, kainate...) a montré chez le chat et le rat un changement radical de comportement. En effet, les animaux présentant un comportement calme et placide sont devenus agressifs et sur la défensive (Bandler et Carrive, 1988; Bandler et al., 1991; Depaulis et al., 1992). Cette dualité entre les parties dorsales et ventrales de la SGPA se retrouve dans d'autres états émotionnels. La stimulation de la partie dorsale et latérale produit des comportements spontanés de sauts et de course, qui s'opposent à l'immobilité qui suit la stimulation de la colonne ventrale de la SGPA (Morgan et al., 1998). La SGPA est donc impliquée dans la gestion des émotions instinctives et peut interagir dans l'appréhension face un *stimulus* prédit comme dangereux.

c. Douleur

Le rôle de la SGPA dans la nociception a été découvert au travers de l'expérimentation de Reynolds et al. (1969). Son étude a montré qu'une stimulation électrique de la SGPA induisait une analgésie suffisamment profonde pour effectuer une opération chirurgicale abdominale sans l'apport d'anesthésique. Cette stimulation viendrait inhiber l'activité des neurones nociceptifs au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (Liebeskind et al., 1973). Par la suite, plusieurs investigations ont étudié l'impact de l'activation de la SGPA. En utilisant une stimulation par micro-injections d'acides

**LA SUBSTANCE GRISE PÉRIAQUUDUCALE : CENTRE DE MODULATION DE LA DOULEUR
ET IMPLICATION DANS L'EFFET ANTINOCICEPTIF DU PARACÉTAMOL ?**

aminés excitateurs, plusieurs effets ont été retrouvés dont une analgésie (Bandler et Shipley, 1994; Morgan et al., 1998). Une autre étude a évalué l'impact de lésion électrolytique de la dl-SGPA et de la vl-SGPA sur la nociception (Lei et al., 2014). Le constat est que la lésion de la dl-SGPA est capable d'inhiber une hyperalgie mécanique, alors que la lésion de la vl-SGPA bloque l'hypoalgie thermique induite par les contrôles descendants. Ainsi, la dl-SGPA et la vl-SGPA peuvent respectivement intervenir dans la facilitation ou l'inhibition de la douleur par les contrôles descendants (Lei et al., 2014), ce qui confirme le rôle primordial de la SGPA dans la modulation endogène de la nociception.

L'équipe de Green et al. s'est appuyée sur les données issues de l'animal pour prouver le potentiel de la stimulation profonde au niveau de la SGPA chez l'homme. Leurs résultats, très encourageants, ont montré que la stimulation de la partie ventrale de la SGPA pouvait conduire à une analgésie et que cette méthode pouvait représenter une alternative thérapeutique pour le traitement des douleurs chroniques neuropathiques réfractaires aux traitements pharmacologiques (Young et Chambi, 1987; Bittar et al., 2005; Green et al., 2006b, 2007). Plusieurs autres études cliniques ont permis d'obtenir les résultats présentés dans le **Tableau 10**.

Nombre de patients	Efficacité à court terme	Efficacité à long terme
6	6 (100%)	5 (83%)
22		16 (73%)
17		0 (0%)
11	11 (100%)	9 (82%)
65	64 (98%)	50 (77%)
7		7 (100%)
7	7 (100%)	2 (29%)
33	29 (88%)	22 (67%)
42		33 (79%)
17	16 (94%)	15 (88%)
52	45 (87%)	33 (63%)
5	5 (100%)	
4	1 (25%)	
8	0 (0%)	
14	0 (0%)	
52	30 (58%)	18 (35%)
3	0 (0%)	

Tableau 10. Récapitulatif des essais cliniques concernant la stimulation électrique profonde de la SGPA dans le traitement des douleurs chroniques. Efficacité de la stimulation profonde de la SGPA à court terme et à long terme chez des patients atteints de douleurs chroniques incurables. L'efficacité à court terme correspond à l'évaluation du soulagement de la douleur chez le patient éveillé et stimulé pendant la chirurgie d'implantation des électrodes. L'efficacité à long terme concerne les effets de la stimulation les mois suivant l'implantation des électrodes. D'après Bittar et al., 2005; Mai et Paxinos, 2011.

II. Rôle de la substance grise périaqueducale dans la modulation de la douleur

Nous avons précédemment évoqué les fonctions clés de la SGPA dans le réseau des voies descendantes sérotoninergiques bulbo-spinales. Dans un 1^{er} temps, nous détaillerons les mécanismes cellulaires impliqués dans la modulation des contrôles descendants puis nous aborderons les remaniements engendrés par les douleurs pathologiques chroniques.

1. Mécanismes cellulaires mis en jeu dans la modulation des contrôles descendants

L'activité de la SGPA est dépendante d'un **équilibre entre facteur excitateur (glutamate) et facteur inhibiteur (GABA, Figure 32)**. L'injection *in situ* d'un acide aminé excitateur ou d'un inhibiteur du transport au glutamate peut moduler positivement la SGPA et donc activer les voies descendantes sérotoninergiques (Bandler et Shipley, 1994; Morgan et al., 1998, 2009; Drew et al., 2008, **Figure 32B**). D'autre part, plusieurs auteurs ont montré qu'une désinhibition GABAergique de la SGPA induit également un effet antinociceptif *via* l'activation des contrôles descendants (Drew et al., 2008; Liao et al., 2011; Lau and Vaughan, 2014; Lau et al., 2014). Il existe de nombreux récepteurs post-synaptiques pouvant directement moduler la SGPA, tout comme certains récepteurs pré-synaptiques présents sur les afférences glutamatergiques et GABAergiques peuvent respectivement activer ou inhiber la SGPA.

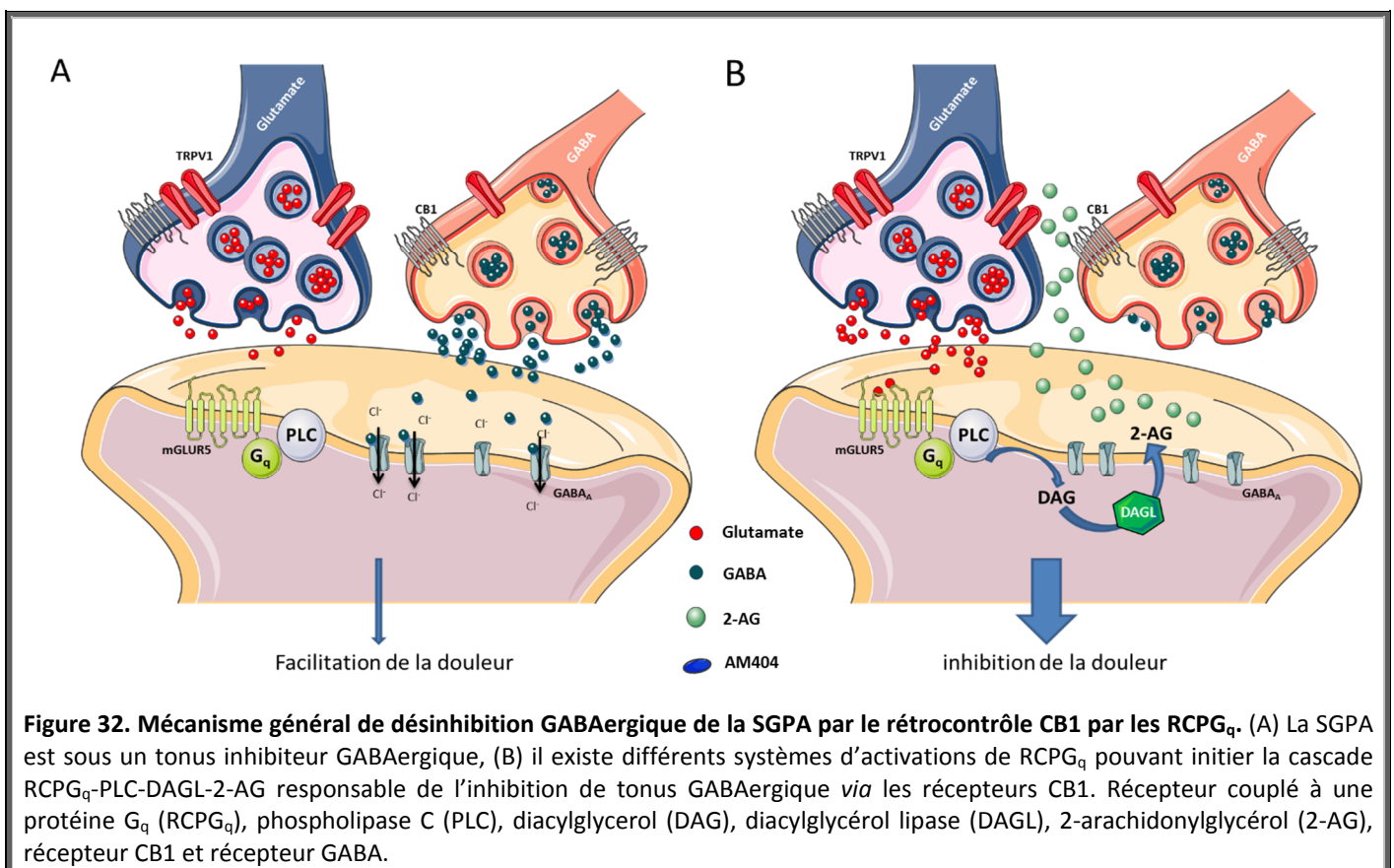
Au niveau des afférences entrantes dans la SGPA, différents récepteurs pré-synaptiques (notamment les récepteurs CB1 et TRPV1) sont exprimés sur ces deux types de fibres (glutamatergiques/GABAergiques). Leurs rôles interviennent dans la modulation de cet équilibre en glutamate et GABA, pour sélectivement favoriser une activation ou une inhibition de la SGPA qui va respectivement inhiber ou faciliter la douleur. À l'état basal, la SGPA est sous un tonus inhibiteur GABAergique.

D'autres systèmes peuvent intervenir pour moduler l'activité de la SGPA **au niveau de récepteurs post-synaptiques**. La **Figure 33** résume l'ensemble des systèmes pouvant intervenir dans la modulation de la SGPA. L'activité de la SGPA dans la modulation de la douleur implique une cascade de signalisations cellulaires pouvant être initiées par différents systèmes (**Figure 33**). Le point commun à tous ces systèmes est **un récepteur RCPG_q** exprimé au niveau de la synapse post-synaptique de la SGPA. La fixation du ligand provoque l'activation de la protéine G_q sous forme liée au GTP. Cela conduit à sa translocation vers la phospholipase C β (PLCβ), qui permet de catalyser la réaction d'hydrolyse du PIP2 en inositol triphosphate (IP3) puis la formation de diacylglycérol (DAG).

LA SUBSTANCE GRISE PÉRIQUODUCALE : CENTRE DE MODULATION DE LA DOULEUR ET IMPLICATION DANS L'EFFET ANTINOCICEPTIF DU PARACÉTAMOL ?

Le DAG est ensuite hydrolysé par la diacylglycérol lipase α (DAGL α) pour générer l'endocannabinoïde **2-AG**. Ce dernier qui diffuse au travers des membranes synaptiques pour activer **les récepteurs CB1 pré-synaptiques** (Kano et al., 2009; Reisenberg et al., 2012; Hu et al., 2014, **Figure 32**). La particularité des récepteurs CB1, au niveau de certaines régions supra-spinales, est qu'ils sont exprimés majoritairement au niveau pré-synaptique des interneurons inhibiteurs GABAergiques. Leur activation revient donc à bloquer la libération de GABA et, par conséquent, **désinhiber le tonus inhibiteur** sur la SGPA, ce qui **active les contrôles descendants** (Marsicano et Lutz, 1999, 2006; Freund et al., 2003).

De nombreux systèmes peuvent ainsi moduler la douleur *via* cette cascade, soit en activant directement au niveau post-synaptique des RCPG $_q$, soit en modulant la libération de glutamate et de GABA (**Figure 32**).



a. Système endocannabinoïdérique

La SGPA présente une composante endocannabinoïdérique très importante. Elle intervient dans divers phénomènes biologiques, dont la modulation de la douleur (Kano et al., 2009; Lau et al., 2014). Il a été montré qu'une stimulation douloureuse (injection i.pl. d'une solution de formaldéhyde 4%) induit une libération d'endocannabinoïdes au niveau de la SGPA (Walker et al., 1999). Ces endocannabinoïdes ainsi libérés réduisent les symptômes douloureux *via* une levée d'inhibition et

donc un renforcement des contrôles descendants (Luchicchi et Pistis, 2012). Plusieurs auteurs ont noté que l'administration systémique ou *in situ* (dans la vl-SGPA) d'un agoniste CB1 induit un effet antinociceptif (Lichtman et al., 1996; Palazzo et al., 2001). Il est aussi possible d'induire un effet antinociceptif en augmentant artificiellement le taux d'endocannabinoïdes au niveau de la SGPA, grâce à des inhibiteurs des enzymes de recapture ou de dégradation des endocannabinoïdes (comme l'URB597, AM602 ou le JZL184 (Maione et al., 2006; Lau et al., 2014). L'effet analgésique provoqué par la stimulation profonde de la SGPA est par ailleurs bloqué par ce même antagoniste (Walker et al., 1999). L'effet inverse peut être retrouvé puisque l'administration d'un antagoniste des récepteurs CB1 (SR141716A) dans la SGPA accentue l'hyperalgie sur les tests au formol et de la plaque chaude (Richardson et al., 1998a). Cet effet inhibiteur, qu'il soit initié par des agonistes endogènes ou exogènes, recruterait l'axe bulbo-spinal (SGPA-RVM-moelle épinière) *via* la voie décrite précédemment (**Figure 32**). Les récepteurs CB1 étant présent majoritairement sur les terminaisons pré-synaptiques des interneurons GABAergiques (Marsicano and Lutz, 1999; Freund et al., 2003), leur activation revient à lever le frein GABAergique pour renforcer les voies descendantes inhibitrices de la douleur.

b. Système endovanilloïde

Les récepteurs TRPV1 dans la vl-SGPA ont un rôle dans la modulation de la douleur. En effet, l'injection intranucléaire d'un agoniste des récepteurs TRPV1 (capsaïcine, 6 nmol) induit un effet antinociceptif sur des tests de douleur thermique (test de la plaque chaude, « *tail flick test* » ou encore « *plantar test* ») (Palazzo et al., 2002; McGaraughty et al., 2003; Starowicz et al., 2007; Mohammadi-Farani et al., 2010; Liao et al., 2011). Inversement, le blocage du récepteur TRPV1 dans la SGPA (iodorésiniferatoxine, 0,5 nmol) induit à lui seul une hyperalgie thermique (Starowicz et al., 2007). L'effet antinociceptif dû à l'agoniste des récepteurs TRPV1 est bloqué par sa co-administration avec l'antagoniste résiniferatoxine (0,5 nmol) (Starowicz et al., 2007).

Entre 2002 et 2011, plusieurs équipes ont mis en évidence le mécanisme mis en jeu dans l'effet antinociceptif des agonistes TRPV1 administrés dans la vl-SGPA. L'effet est corrélé à un renforcement des contrôles descendants (Palazzo et al., 2002; Liao et al., 2011). Une voie cellulaire a également été proposée : l'activation du récepteur TRPV1 exprimé au niveau pré-synaptique des fibres afférentes glutamatergiques de la SGPA conduit à une libération de glutamate. Ce glutamate va en retour stimuler les récepteurs mGLUR5 (RCPG_q) au niveau post-synaptique de la SGPA pour initier la cascade précédemment expliquée (**Figure 32**). La stimulation de la synthèse du 2-AG qui résulte de cette cascade va alors permettre une activation des récepteurs CB1 et donc une inhibition du tonus GABAergique sur les contrôles descendants. Ainsi, l'effet antinociceptif de l'activation des

récepteurs TRPV1 dans la SGPA dépend d'une activation des récepteurs CB1 et d'un renforcement des contrôles descendants (Liao et al., 2011; Gregg et al., 2012).

Il faut malgré tout émettre un bémol sur cet effet. Il a été démontré que l'activation des récepteurs CB1 n'est pas toujours corrélée avec un effet antinociceptif. Les travaux de Maione et al. (2006) montrent qu'une faible quantité d'agoniste CB1 (WIN55,212-2) ou d'inhibiteur de dégradation des endocannabinoïdes (URB597) administré dans la vl-SGPA s'avère être pronociceptif dans le test de Hargreaves. Il faut savoir que les récepteurs CB1 sont majoritairement présents sur les terminaisons GABAergiques. Il y a également, en moindre quantité, des récepteurs CB1 sur les terminaisons glutamatergiques, ce qui amène à considérer 2 possibilités pour expliquer ce phénomène pro/antinociceptif :

- À faibles doses, un agoniste CB1 (WIN55,212-2) favoriserait l'activation des récepteurs CB1 présents sur les terminaisons présynaptique glutamatergiques. Il y aurait une inhibition du relargage de glutamate et une inactivation des contrôles descendants. L'URB597 à faible dose favoriserait l'augmentation du 2-AG qui, prioritairement, activerait les récepteurs CB1 présents sur les fibres glutamatergiques.
- À forte dose, le WIN55,212-2 favoriserait l'activation des récepteurs CB1 des fibres GABAergiques, levant ainsi l'inhibition. L'URB597 à forte dose augmenterait les taux d'AEA et de 2-AG. Il y aurait donc à la fois une activation des TRPV1 et une inhibition GABAergique *via* les récepteurs CB1.

Ces auteurs ont aussi mis en évidence que l'hyperalgie induite par une faible dose d'URB597 est relayée par une diminution de la fréquence de dépolarisation des cellules OFF et une augmentation de la réponse des cellules ON. Cet effet est dépendant des récepteurs CB1. Et inversement, l'analgésie médiée par une forte dose d'URB597 est corrélée à une augmentation de la fréquence de dépolarisation des cellules OFF et une diminution de la réponse des cellules ON, qui cette fois est dépendant des récepteurs TRPV1.

Les récepteurs CB1 et TRPV1 dans la SGPA ont donc un rôle important dans le contrôle dynamique des contrôles descendant *via* la RVM.

c. Système mGLUR

La représentation des récepteurs mGLUR au niveau des projections pré-synaptiques de la SGPA est plus diversifiée. L'effet antinociceptif ou pronociceptif dépend du récepteur glutamatergique recruté. Ces récepteurs sont classés en 3 familles :

- Les mGLUR I (mGLUR₁ et mGLUR₃) sont des récepteurs RCPG_q dont l'activation au niveau de la SGPA induit un effet antinociceptif (Maione et al., 1998a, 2000).
- Les mGLUR II (mGLUR₂ et mGLUR₃) sont des récepteurs RCPG_{i/o}, dont l'activation induit un effet pronociceptif (Maione et al., 1998a, 2000).
- Les mGLUR III (mGLUR₄ ; mGLUR₆, mGLUR₇, mGLUR₈) sont des récepteurs RCPG_{i/o} plaidant en faveur d'un effet pronociceptif (Maione et al., 1998a, 2000). Par exemple, il a été montré que l'activation spécifiquement des récepteurs mGLUR₇ diminuait les seuils de douleur, traduisant une inhibition des voies descendantes en faveur d'un effet facilitateur de la douleur (Marabese et al., 2007).

Ces récepteurs sont activés par la libération de glutamate provenant des synapses pré-synaptiques des neurones glutamatergiques. La stimulation de ce relargage peut être opérée par l'activation en amont d'autres systèmes (dont le système neurokinine/neurotensine/cholecystokinine expliqué ci-dessous) ou bien par des récepteurs pré-synaptiques tels que le récepteur TRPV1. Plusieurs ligands endogènes de ces récepteurs TRPV1 comme les endovanilloïdes et certains endocannabinoïdes (AEA) peuvent stimuler la libération de glutamate (Maione et al., 2006; Kawahara et al., 2011), ce qui pourrait d'ailleurs expliquer l'implication du système endocannabinoïdérique dans la modulation de la douleur. Certains ligands exogènes comme la capsaïcine peuvent également stimuler la libération de glutamate (Liao et al., 2011).

Au vu des effets antinociceptifs des agonistes mGLUR I, et plus particulièrement le sous-type mGLUR₅ (Drew et al., 2008; Gregg et al., 2012), plusieurs travaux ont été menés pour comprendre son mécanisme. Le récepteur mGLUR₅ est principalement exprimé au niveau pré-synaptique des fibres glutamatergiques. De plus, son activation induit à la fois une désinhibition des courants GABAergiques et un effet antinociceptif. Cet effet est bloqué par un antagoniste mGLUR₅ (MPEP) ou un antagoniste des récepteurs CB1 (AM251). Le mécanisme mis en jeu est le même que pour l'orexine et la choline. Le récepteur mGLUR₅ est un RCPG_q, dont l'activation initie la cascade (Cf. **1. Mécanismes cellulaires mis en jeu dans la modulation des contrôles descendants** et **Figure 32**) responsable de la levée de l'inhibition GABAergique sur la SGPA (**Figure 33**, Drew et al., 2008; Liao et al., 2011; Gregg et al., 2012; Wilson-Poe et al., 2013; Hu et al., 2014; Palazzo et al., 2014). Ainsi, ce système est à même de moduler la réponse nociceptive *via* les contrôles descendants.

d. Système orexine

Les orexines (OXA et OXB) est un neuropeptide hypothalamique. Il exerce différentes fonctions biologiques comme le sommeil, le système de la récompense, l'homéostasie énergétiques et intervient dans le contrôle de la douleur (Chiou et al., 2010). Son mécanisme implique l'activation de récepteurs RCPG_q : OX1 et OX2 (Chiou et al., 2010; Hu et al., 2014, **Figure 33**). Ces récepteurs sont exprimés entre autres dans la zone perifornicale et latérale de l'hypothalamus, et y projettent leurs neurones sur la SGPA (Peyron et al., 1998; Horvath et al., 1999). Il a été montré qu'une injection dans la vl-SGPA d'un agoniste des OX1 induit un effet antinociceptif (Azhdari Zarmehri et al., 2011). Son rôle dans la douleur a été élucidé par l'article de Ho et al. (2011), montrant l'implication des récepteurs OX1 dans la modulation de la douleur au niveau de la SGPA. Son mécanisme montre que l'activation du récepteur OX1 par l'OXA réduit les courants inhibiteurs GABAergiques par la technique d'électrophysiologie sur tranche de SGPA. L'utilisation d'antagonistes des récepteurs OX1 et CB1 bloquent ces courants inhibiteurs GABAergiques, ce qui traduit l'implication d'un système orexine dépendant des récepteurs OX1 et CB1. Il existe des similitudes entre le système cannabinoïde et le système orexine au niveau de la SGPA. En effet, l'administration d'un agoniste CB1 (WIN55,212-2) dans la SGPA mime les effets de l'OXA. De même, un inhibiteur de l'enzyme de dégradation du 2-AG, la MAGL (URB602) amplifie l'action de l'OXA. Plusieurs données justifient que l'effet antinociceptif de l'orexine dans la SGPA est dépendant de la cascade cellulaire détaillée précédemment (Cf. **3^{ème} Chap.II.1. Mécanismes cellulaires mis en jeu dans la modulation des contrôles descendants**) puisque l'inhibition de chacun de ces acteurs (PLC, DAGL) bloque l'effet antidépresseur de l'OX1 sur les courants GABAergiques (Ho et al., 2011). Le système orexine est semble être un acteur impliqué dans la modulation de la douleur au travers d'une activation des voies descendantes (**Figure 33**).

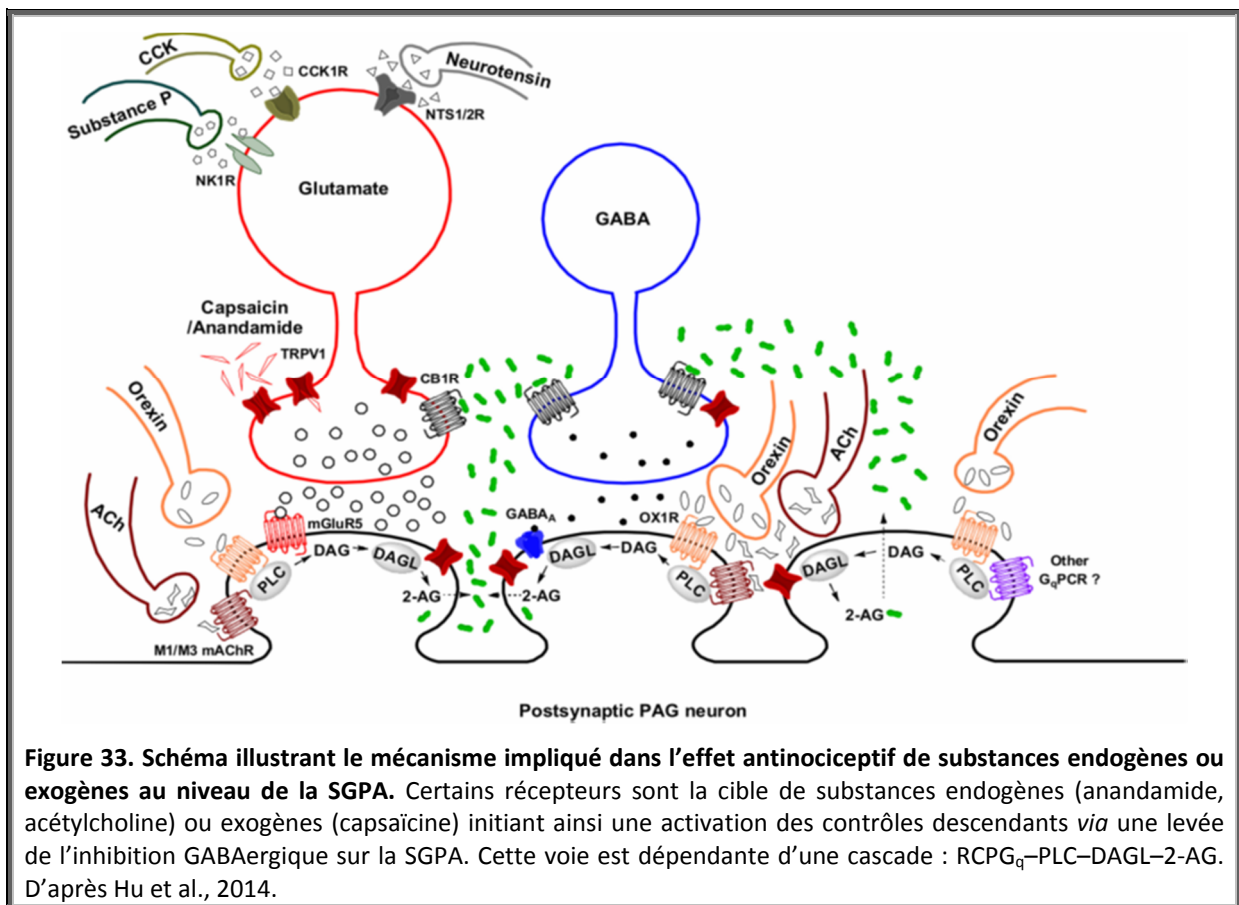
e. Système cholinergique

La SGPA reçoit des projections cholinergiques provenant du *tegmentum* pontique (Woolf et al., 1990). Il a été montré qu'une injection d'agoniste cholinergique dans la SGPA produit un effet analgésique (Guimarães et al., 2000; Lau and Vaughan, 2008). Une étude électrophysiologique (« *patch clamp* » sur tranche) montre que l'application de carbachol (agoniste cholinergique non spécifique) ou d'un inhibiteur de l'enzyme de dégradation de l'acétylcholine (acétylcholinestérase) tel que la physostigmine supprime les courants inhibiteurs GABAergiques (Lau et Vaughan, 2008). Le mécanisme décrit que la stimulation de la libération d'acétylcholine va activer les récepteurs M1/M3 sur les fibres post-synaptiques. Ces récepteurs M1/M3 sont des RCPG_q initiant les voies précédemment indiquées (Cf. **3^{ème} Chap.II.1. Mécanismes cellulaires mis en jeu dans la modulation des contrôles descendants**). En effet, l'action du carbachol est réduite par l'application d'un

antagoniste muscarinique M1/M3. DE la même manière que pour l'orexine, il est suggéré que les effets des agonistes cholinergiques au niveau de la SGPA induit la synthèse de 2-AG. Le 2-AG diffusant au niveau extracellulaire active les récepteurs CB1 pré-synaptiques des fibres GABAergiques et bloque ainsi la libération de GABA. La conséquence sera une désinhibition des contrôles descendants et un effet antinociceptif (Hu et al., 2014, **Figure 33**).

f. Système neurokinine/neurotensine/cholécystokinine

En amont de la SGPA, au niveau du soma des neurones glutamatergiques projetant sur la SGPA, divers récepteurs peuvent moduler la libération de glutamate (**Figure 33**). La substance P, la neurokinine et la cholécystokinine peuvent activer respectivement les récepteurs à la neurokinin 1, à la neurotensine 1/2 et CCK1 pour induire un effet antinociceptif *via* la stimulation de la libération de glutamate (Behbehani et Pert, 1984; Rosén et al., 2004; Mitchell et al., 2011). Leurs activations provoquent une réduction des courants inhibiteurs GABAergiques. Cependant, cette action est annihilée par l'inhibition des récepteurs mGLUR5 (MPEP) et CB1 (AM251), rétablissant la transmission GABAergique (Drew et al., 2009; Mitchell et al., 2009, 2011). Ces données justifient l'implication de la voie de désinhibition de la SGPA par le récepteur RCPG_q mGLUR5.



g. Système opioïdérique

Il existe également sur les interneurons GABAergiques des récepteurs opioïdériques exprimés sur les fibres dendritiques pré-synaptiques et colocalisés avec les récepteurs CB1. Il a été décrit que l'activation de ces récepteurs induit, tout comme les récepteurs CB1, une réduction du tonus inhibiteur GABAergique (Lau et Vaughan, 2008; Wilson-Poe et al., 2012). Ce mécanisme expliquerait l'action centrale attribuée à la morphine (Loyd et al., 2007; Morgan et al., 2014; Wilson-Poe et al., 2014). L'action de la morphine sur la SGPA sera détaillée en discussion.

2. Adaptation et plasticité de la SGPA en condition physiopathologique

La douleur aiguë (nociceptive, lésion cutanée, inflammation aiguë...) est un processus physiologique d'alerte pour l'organisme lui permettant de mettre en œuvre divers mécanismes de défense lorsqu'il y a une atteinte à l'intégrité de l'organisme. En retour, l'organisme lutte contre les excès de nociception par des systèmes de régulations présents tout le long du cheminement du message nociceptif jusqu'aux centres supérieurs. **En condition physiologique, la douleur est donc une réponse « normale » dont l'intensité est adaptée par les systèmes de modulation de la douleur pour conserver l'intégrité de l'homéostasie.**

La douleur peut être aussi considérée comme une maladie lorsqu'elle se chronicise. **Une douleur chronique** est alors considérée comme une **pathologie** à part entière. Les processus modulateurs s'en retrouvent déséquilibrés et deviennent inefficaces. Ce dysfonctionnement entraîne des modifications apparentées à de la **plasticité** qui se traduisent souvent par des **remaniements anatomiques, neurochimiques et fonctionnels des voies de la douleur** et aboutissant à un état de sensibilisation douloureuse (Bouhassira, 2008; Nickel et al., 2012). Des études réalisées chez l'animal ont montré qu'une lésion nerveuse périphérique peut induire d'importantes modifications fonctionnelles, histologiques et neurochimiques au niveau périphérique, médullaire et supra-spinal. Ces modifications sont induites par l'hyperexcitabilité des neurones périphériques, mais aussi centraux induisant un phénomène de **sensibilisation centrale**.

L'entretien de cette hypersensibilité centrale est aussi dépendant des systèmes de modulation de la douleur. Une diminution de cette excitabilité par l'injection d'un anesthésique locale au niveau de la SGPA ou de la RVM (20 µg de lidocaïne) réduit les comportements douloureux dans un modèle de neuropathie. Ceci suggère que le développement et le maintien des comportements nociceptifs peuvent dépendre de la boucle spino-bulbo-spinale (Pertovaara et al., 1996; Burgess et al., 2002). Des travaux montrent que l'atténuation de la douleur par les microinjections de lidocaïne n'est efficace que 7 jours après induction de la neuropathie, ce qui traduit un remaniement à long terme des contrôles descendants favorisant alors le passage de la

douleur (Burgess et al., 2002). En effet, 7 jours après une ligature du nerf spinal, il y a une augmentation des décharges spontanées des cellules ON et une diminution des décharges des cellules OFF au niveau du RVM (Carlson et al., 2007; Gonçalves et al., 2007). Il y aurait une possible perte de l'activité neuronale des cellules OFF et donc un effet en faveur d'une facilitation de la douleur (Leong et al., 2011). Dans plusieurs modèles de douleur neuropathique (ligature du nerf spinal ou rat diabétique), une diminution de la 5-HT et de la 5-HIAA est observée au niveau médullaire et dans le RVM (noyau raphé, Sounvoravong et al., 2004; Liu et al., 2010). L'ensemble de ces données démontre qu'en condition de **douleur neuropathique les contrôles descendants sont altérés et deviennent inefficaces pour réduire ces douleurs.**

Au niveau de la SGPA, les mécanismes de plasticité modifient son activité. Une étude montre dans un modèle de douleur neuropathique (ligature du nerf spinal), une **diminution de l'excitabilité glutamatergique** parallèlement à une **diminution du potentiel activateur des contrôles** descendants au niveau de la vl-SGPA (Ho et al., 2013). Une diminution de l'expression des récepteurs CB1 est également notée. Chez l'animal sain, la micro-injection dans la vl-SGPA d'un agoniste CB1 (WIN55,212-2, 2 à 8 nmol) induit un effet antinociceptif (test du « *tail flick* ») dépendant des récepteurs mGLUR5 et une augmentation de l'activité des cellules OFF (Palazzo et al., 2012). En contexte de neuropathie, l'effet antinociceptif des agonistes CB1 induit par l'augmentation de l'activité des cellules OFF nécessite une quantité beaucoup plus importante de WIN55,212-2 (16 nmol, Palazzo et al., 2012). Plus généralement, **les douleurs neuropathiques diminuent la sensibilité des mécanismes d'inhibition de la nociception et favorisent les voies facilitatrices de la douleur (Figure 34, Jaggi and Singh, 2011).**

Malgré tout, les voies descendantes modulatrices de la douleur ne sont pas complètement inhibées. Une étude clinique montre que sur 18 patients atteints de neuropathies diverses (syndrome du membre fantôme, douleur post-accidents vasculaires cérébraux...), une stimulation électrique profonde de la SGPA permet une amélioration générale de l'humeur et de la qualité de vie, directement corrélée avec une réduction de la douleur (Gray et al., 2014).

En résumé, les douleurs neuropathiques engendrent de nombreux changements particulièrement complexes au niveau cellulaire et moléculaire. L'étude des bases physiopathologiques des douleurs neuropathiques est sans conteste un des domaines les plus actifs dans les recherches en neurosciences.

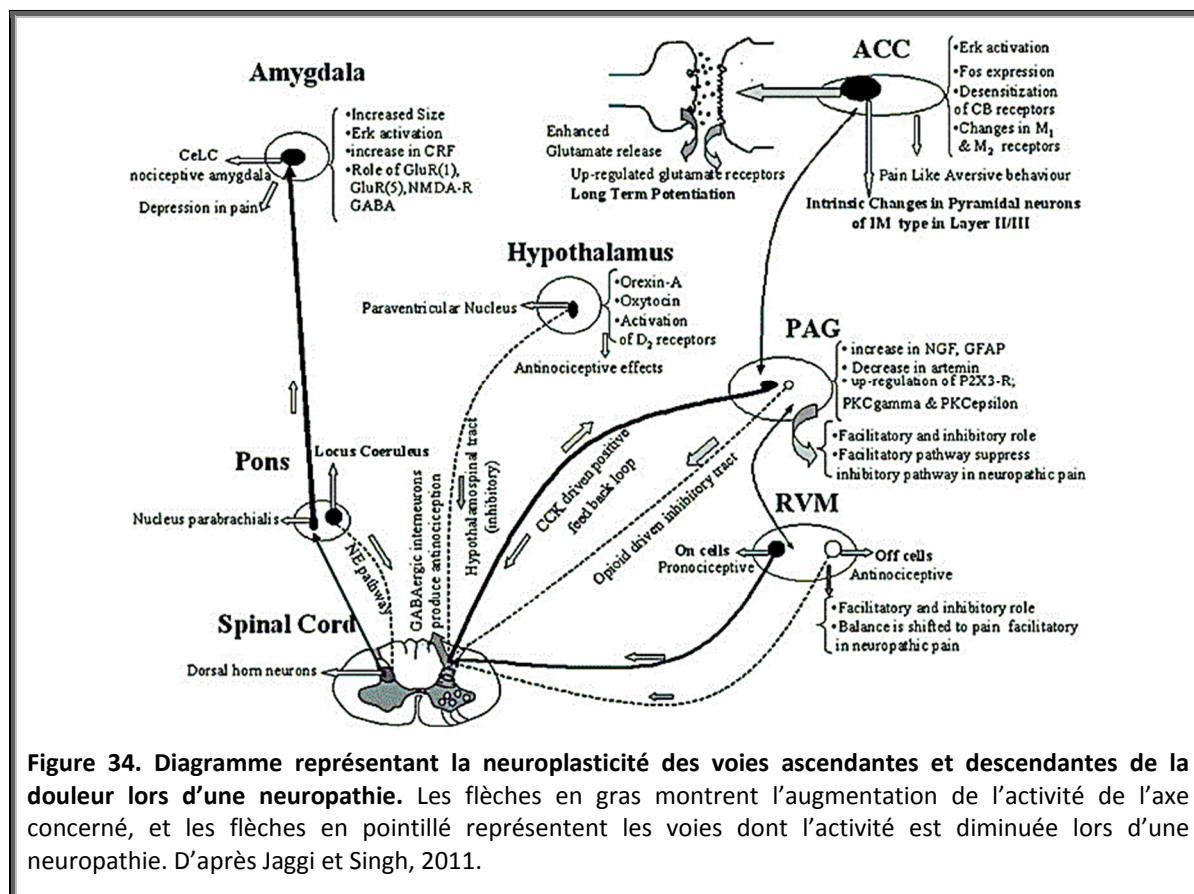


Figure 34. Diagramme représentant la neuroplasticité des voies ascendantes et descendantes de la douleur lors d'une neuropathie. Les flèches en gras montrent l'augmentation de l'activité de l'axe concerné, et les flèches en pointillé représentent les voies dont l'activité est diminuée lors d'une neuropathie. D'après Jaggi et Singh, 2011.

III. La substance grise périaqueducale : une cible potentielle dans l'action antalgique du paracétamol ?

1. Etude IRMf : variation du signal BOLD de la substance grise périaqueducale après administration de paracétamol

Les recherches concernant le mécanisme d'action antalgique du paracétamol (Högestätt et al., 2005; Mallet et al., 2008, 2010; Kerckhove et al., 2014) ont jusqu'à présent révélé que :

- L'effet antalgique du paracétamol résultait de la **formation cérébrale** d'un métabolite, l'**PAM404**.
- L'action antinociceptive du paracétamol impliquait, au niveau **supra-spinal**, les récepteurs **TRPV1**, **CB1** et le canal **Cav3.2**.
- L'effet du paracétamol passait par un **renforcement des contrôles descendants sérotoninergiques**.

Néanmoins, l'**origine cérébrale** et le **mécanisme mis en jeu** ne sont pour l'instant pas encore élucidés (Cf. **OBJECTIF**).

Des travaux antérieurs ont permis d'attirer notre attention sur une région cérébrale clé, la **SGPA**, et plus particulièrement sur sa partie ventrolatérale (**Barrière et al., 2^{ème} article en cours**). En effet, ces données se sont appuyées sur une technique non invasive d'IRMf pour évaluer l'impact d'une administration de paracétamol (300 mg/kg, *p.o.*) sur l'activité du signal BOLD de diverses régions cérébrales (**Figure 44** et **Figure 45**). Les résultats ainsi obtenus indiquent que plusieurs régions impliquées dans la douleur voient leur signal BOLD varié après administration du paracétamol. Notre intérêt s'est principalement focalisé sur la SGPA, car cette dernière région du tronc cérébral répond à plusieurs critères qui en fait un candidat idéal en tant que substrat de l'action antalgique du paracétamol :

- La SGPA est un carrefour entre l'intégration du message nociceptif par les voies ascendantes et l'initiation des voies descendantes sérotoninergiques dans la modulation de la douleur (Millan, 2002).
- La SGPA exprime les 3 acteurs clés, TRPV1/CB1/FAAH, à l'action du paracétamol (**Figure 47**).
- L'activation des récepteurs TRPV1 et CB1 dans la SGPA résulte en un effet antinociceptif dépendant des contrôles descendants (Liao et al., 2011; Luchicchi and Pistis, 2012; Lau et al., 2014).

2. Expression des acteurs clés nécessaires à l'action antalgique du paracétamol : FAAH/CB1/TRPV1

Les données IRMf ont positionné la vl-SGPA comme une cible potentielle du paracétamol dans son action centrale. Un marquage immunohistologique des récepteurs TRPV1 et CB1, ainsi que de l'enzyme FAAH, a révélé leurs coexpressions dans la vl-SGPA (**Figure 47**), confirmant l'intérêt pour ce noyau. D'autres articles relatent également une expression et un rôle fonctionnel dans la nociception de ces acteurs dans la SGPA.

En effet, l'**enzyme FAAH** est fonctionnellement présente au niveau de la vl-SGPA. Une étude a montré que dans la SGPA, il existe une activité catalytique de l'AEA dépendante de l'enzyme FAAH (Glaser et al., 2006). D'autres travaux montrent que l'inhibition de la FAAH au sein de la vl-SGPA interagit avec le circuit de la douleur et les taux d'endocannabinoïdes (Maione et al., 2006; Kawahara et al., 2011; Lau et al., 2014). L'enzyme FAAH est donc exprimée et fonctionnelle dans la SGPA.

Concernant le **récepteur TRPV1**, il est aussi exprimé dans la SGPA. Une étude précédemment décrite (Cavanaugh et al., 2011, Cf. **2^{ème} Chap.II.3.a. Les récepteurs vanilloïdes : généralités**) utilise une souche de souris C57Bl6J Trpv1-LacZ, ce qui a permis de montrer que ce récepteur est retrouvé de manière discrète dans la vl-SGPA (Cavanaugh et al., 2011). D'autres études d'immunohistologie

confirment la présence de ces récepteurs vanilloïdes dans la vl-SGPA (Cristino et al., 2006; Maione et al., 2006; Casarotto et al., 2011). L'injection d'agoniste TRPV1 dans la vl-SGPA réduit les comportements douloureux traduisant d'une activité fonctionnelle de ces récepteurs à ce niveau (McGaraughy et al., 2003; Liao et al., 2011).

Le rôle du **récepteur CB1** dans la vl-SGPA a été beaucoup étudié, en particulier pour ses fonctions dans la modulation de la douleur (Chiou et al., 2013; Hu et al., 2014; Lau et al., 2014). On le retrouve d'ailleurs exprimé au niveau de la vl-SGPA (Tsou et al., 1998; Cristino et al., 2006; Maione et al., 2006; Casarotto et al., 2011).

Quant au **canal Cav3.2**, aucune donnée ne permet de justifier son expression au niveau de la SGPA. Néanmoins, des données utilisant une souris « *knock-in* » Cav3.2-GFP montrent la présence de ces récepteurs au niveau central (François et al., 2015).

Ainsi, **chacun des acteurs clés impliqués dans le mécanisme d'action antalgique du paracétamol est exprimé et présente une activité fonctionnelle au niveau de la SGPA**. Ceci justifie notre intérêt pour ce noyau supra-spinal.

3. Activation des récepteurs TRPV1 et CB1 dans la substance grise périaqueducale induit une analgésie dépendant des contrôles descendants

De nombreux arguments ont montré l'intérêt des **récepteurs TRPV1** cérébraux dans la nociception. Ce récepteur présente une dualité avec un effet pronociceptif en périphérie et un **effet antinociceptif au niveau cérébral** (Cavanaugh et al., 2011, Cf. 2^{ème} Chap.II.3.a. Les récepteurs vanilloïdes : généralités). Sachant que l'AM404 est formé au niveau cérébral et qu'il peut interagir avec les récepteurs TRPV1, notre intérêt s'est porté sur ce dernier. Les travaux de Mallet et al. (2010) ont également montré l'implication de ces récepteurs au niveau central dans l'effet antalgique du paracétamol. Mais la question du rôle de ces récepteurs dans la SGPA reste à définir : ils sont exprimés au niveau de la vl-SGPA, mais **ont-ils un rôle analgésique ?** Et, si c'est le cas, les contrôles descendants de l'**axe bulbo-spinal sont-ils mis en jeu ?**

L'administration de capsaïcine dans la vl-SGPA (6 nmol) réduit les comportements douloureux sur le test de la plaque chaude (Liao et al., 2011). Il a été montré que parallèlement à l'**effet antinociceptif des agonistes TRPV1**, il y avait une augmentation du relargage du glutamate dans la RVM. En retour, la co-administration de l'antagoniste TRPV1 (iodorésiniferatoxine) prévient l'augmentation de glutamate dans la RVM induit par l'agoniste TRPV1 (capsaïcine) (Starowicz et al., 2007). Dans la même étude, l'activité des cellules ON/OFF dans la RVM est mesurée après activation

des récepteurs TRPV1 dans la vl-SGPA. Les résultats obtenus sont en corrélation avec une activation des contrôles descendants inhibiteurs de la douleur puisque l'activation des récepteurs TRPV1 dans la vl-SGPA conduit à une augmentation de l'activité des cellules OFF et une diminution de l'activité des cellules ON. *A contrario*, l'action hyperalgique d'un antagoniste des récepteurs TRPV1 injecté dans la vl-SGPA est corrélée à une augmentation de l'activité des cellules ON et une diminution de l'activité des cellules OFF (Starowicz et al., 2007). Ces résultats ont d'ailleurs été confirmés par les travaux de McGaraughty et al. (2003). **Une activation des récepteurs TRPV1 dans la vl-SGPA permet donc de produire un effet antinociceptif dépendant des contrôles descendants.**

Concernant les récepteurs CB1, les effets analgésiques des cannabinoïdes ont fait leurs preuves. Leurs actions, aussi bien périphériques que centrales, montrent une efficacité sur de nombreux modèles de douleur comparable aux opioïdes (Richardson, 2000; Walker et al., 2002; Cravatt et Lichtman, 2004; Hohmann et Suplita, 2006; Jhaveri et al., 2007). Le rôle du récepteur CB1 dans le mécanisme d'action du paracétamol a fait l'objet d'un article (Mallet et al., 2008), et d'une partie de ce manuscrit (Cf. **2^{ème} Chap.III.2.e. Implication du récepteur CB1 dans le mécanisme d'action antalgique du paracétamol**). Cependant, aucune preuve ne justifie l'implication des récepteurs CB1 au niveau cérébral dans le mécanisme d'action antalgique du paracétamol. Toutefois, nous suspectons fortement son implication centrale au même titre que le récepteur TRPV1. En effet, de nombreux arguments montrent que l'utilisation d'agoniste exogène ou endogène des récepteurs CB1 dans la vl-SGPA produit un effet analgésique (Luchicchi and Pistis, 2012; Lau et al., 2014). Par ailleurs, la description de son rôle au sein de la SGPA a fait l'objet de nombreux articles, apportant la preuve d'un mécanisme assez similaire aux opioïdes (Rea et al., 2007; Wilson-Poe et al., 2012, 2014; Lau and Vaughan, 2014). Ainsi, au vu des propriétés pharmacologiques de l'AM404 (inhibiteur de l'AMT et activateur des récepteurs TRPV1), cela laisserait sous-entendre que les récepteurs CB1 au sein de la SGPA pourraient participer à l'effet antalgique du paracétamol.

En dehors des effets antinociceptifs distincts des agonistes TRPV1 et CB1 au niveau de la vl-SGPA, il existe également un **mécanisme cellulaire collaboratif entre ces deux récepteurs**. La **Figure 32** expose ce mécanisme où la désinhibition initiée par l'activation des récepteurs CB1 est liée à la stimulation de la synthèse de 2-AG par l'activation des récepteurs TRPV1. En résumé, il existe au sein de la vl-SGPA un mécanisme en série dépendant des récepteurs TRPV1 et CB1 qui conduit à un effet antinociceptif *via* les contrôles descendants. Ce schéma mécanistique pourrait expliquer l'action antinociceptive du paracétamol, car celui-ci implique à la fois le récepteur TRPV1 et le récepteur CB1 dans le renforcement des voies descendantes sérotoninergiques (Mallet et al., 2012). Il est donc tout à fait pertinent de s'interroger sur le rôle de la SGPA dans le mécanisme d'action antalgique du paracétamol.

OBJECTIFS

1. Le paracétamol : un mécanisme d'action centrale dépendant de l'enzyme FAAH ?

Les travaux menés ces dernières années sur l'étude du mécanisme d'action antalgique du paracétamol ont été très enrichissants. De nombreuses études, entre autres menées par notre équipe, ont réuni **un faisceau d'arguments plaidant en faveur d'un mécanisme d'action central**. Le fait que paracétamol renforce les contrôles descendants sérotoninergiques (Pickering et al., 2008; Mallet et al., 2012) en est un exemple puisque cela démontre qu'il est dépendant d'un **substrat cérébral**. De plus, nos données indiquent que le paracétamol est un promédicament dont le métabolite actif (l'AM404) est **formé, grâce à l'enzyme FAAH, au niveau cérébral** (Högestätt et al., 2005; Barrière et al., 2013). Ce **métabolisme cérébral est nécessaire à l'action antinociceptive du paracétamol** puisqu'une inhibition de l'enzyme FAAH réduit à la fois la synthèse supra-spinale d'AM404 ainsi que l'effet antalgique induit par le paracétamol (Mallet et al., 2008; Barrière et al., 2013).

Cependant, l'ensemble de cette hypothèse mécanistique présente deux controverses qui peuvent limiter son impact :

La 1^{ère} limite de cette controverse est que la mise en évidence du caractère promédicament du paracétamol ait été réalisé **chez l'animal sain**. Or, l'administration de paracétamol chez l'animal sain ne modélise pas l'usage clinique que l'on fait d'un antalgique pour soulager une douleur déjà présente. Il est donc important de valider que notre hypothèse mécanistique puisse être également applicable en contexte pathologique. De plus, nous pouvons imaginer qu'un tout autre mécanisme antalgique puisse se mettre en place lors d'une douleur présente dans un contexte physiopathologique. En effet, dans ce cas, des remaniements structuraux et fonctionnels s'opèrent, ce qui peut entraîner une altération des systèmes impliqués dans le mécanisme d'action du paracétamol.

La 2^{ème} limite à nos études réside dans **l'impossibilité de dissocier une implication centrale et/ou périphérique de l'enzyme FAAH**. Jusqu'à présent, nous avons mis en avant qu'une inhibition pharmacologique ou une délétion génétique de l'enzyme FAAH supprime l'effet antalgique du paracétamol. Mais cette approche consiste en une inhibition globale de l'enzyme FAAH, et une implication centrale *versus* périphérique de la FAAH n'a pas encore été démontrée. De plus, plusieurs études contribuent à alimenter **l'hypothèse historique d'un effet périphérique** (Ferreira et al., 1978; Dani et al., 2007; Arun et al., 2013). Récemment, un auteur a démontré que le mécanisme d'action central du paracétamol *via* la formation supra-spinale d'AM404 était discutable (Ruggieri et al.,

2008). Ces auteurs ont quantifié une synthèse d'**AM404 dans le plasma circulant** après administration de paracétamol, ce qui contredit la formation exclusivement supra-spinale d'AM404 précédemment évoquée (Högestätt et al., 2005). Sachant que l'enzyme FAAH est présente ubiquitairement (Deutsch et al., 2002), sa distribution n'est pas exclusivement cérébrale, ce qui pourrait expliquer la synthèse d'AM404 périphérique.

Le 1^{er} objectif de ce travail de thèse seront donc :

(1) L'étude du le profil d'action du paracétamol dans un contexte de douleur pathologique, plus représentatif de son usage clinique, et ceci afin de généraliser le concept de promédicament du paracétamol. Nous étudierons l'impact d'une délétion génétique ou pharmacologique de l'enzyme FAAH sur le potentiel antalgique du paracétamol dans un contexte de douleur physiopathologique. Pour ceci, nous utiliserons un modèle murin de **douleur inflammatoire sub-chronique induite par injection i.pl. de carragénine**. L'effet du paracétamol sera évalué sur un test thermique (immersion de la patte) et mécanique (test de von-Frey) chez la souris n'exprimant pas l'enzyme FAAH (souris FAAH^{-/-}) ou après l'utilisation d'un inhibiteur de l'enzyme FAAH (URB597).

(2) La caractérisation du rôle central et périphérique de l'enzyme FAAH dans le mécanisme d'action antalgique du paracétamol. Au moyen d'une stratégie pharmacologique originale, nous comparerons les répercussions d'une inhibition centrale et/ou périphérique de l'enzyme FAAH sur le potentiel antalgique du paracétamol. Nous disposons d'un inhibiteur à la fois périphérique et central de l'enzyme FAAH, l'URB597, et d'un inhibiteur strictement périphérique de cette enzyme, l'URB937 (Clapper et al., 2010; Moreno-Sanz et al., 2011, 2012) ne passant pas la barrière hématoencéphalique (BHE). Ainsi, nous pourrions **discriminer l'implication périphérique versus centrale de l'enzyme FAAH** sur le potentiel antalgique du paracétamol.

II. Etude fonctionnelle de l'implication de la substance grise périaqueducule dans l'effet antalgique du paracétamol

L'ensemble des données bibliographiques associées aux résultats obtenus lors de la réalisation de ce 1^{er} objectif démontre que le paracétamol est un **bioprécurseur**, dont l'effet antalgique **dépend de son métabolisme cérébral** en AM404, *via* l'enzyme FAAH.

En dépit des nombreuses recherches, **le mystère qui entoure le site d'action cérébrale du paracétamol n'a pas encore été mis à jour.**

Néanmoins, les précédents travaux de thèse, effectués par David Barrière, se sont appuyés sur une technique **d'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf)**, pour évaluer l'impact du paracétamol, et ceci afin de mettre en évidence un potentiel noyau supra-spinal substrat

de l'effet antinociceptif du paracétamol. Les résultats obtenus, détaillés dans le paragraphe précédent (Cf. **3^{ème} Chap.III.1. Etude IRMf : variation du signal BOLD de la substance grise périaqueducale après administration de paracétamol**), ont mis en évidence une région cérébrale clé, **la SGPA**, dont l'activité BOLD est particulièrement modulée par une administration systémique de paracétamol. Cette région à l'avantage de répondre à un ensemble de critères justifiant son implication dans l'action antalgique du paracétamol :

- La SGPA est étroitement **liée à la modulation de la douleur par les contrôles descendants sérotoninergiques**.
- Elle présente une **activité FAAH**, nécessaire à la formation *in situ* d'AM404
- Elle exprime **les acteurs clés nécessaires à l'effet du paracétamol : les récepteurs TRPV1 et CB1**.
- Une activation des récepteurs CB1 et TRPV1 dans la SGPA permettent de produire **un effet antinociceptif résultant d'un recrutement des contrôles descendants sérotoninergiques**.

L'accumulation de ces preuves fait de la SGPA un candidat idéal dans son action antalgique centrale du paracétamol. Nous souhaitons cependant pharmacologiquement conforter son rôle. Ainsi, le **2^{ème} objectif** présenté dans ce manuscrit sera l'étude de son implication fonctionnelle dans l'action antinociceptive du paracétamol.

Nous commencerons par confirmer que l'activité neuronale de la SGPA est modulée par le paracétamol en quantifiant l'expression de la protéine **c-Fos**, marqueur de l'activité cellulaire. Puis, nous explorerons **la participation de chacun des protagonistes** ayant montrés leurs implications dans l'effet du paracétamol : les métabolites **p-aminophénol** et **AM404**, ainsi que les acteurs cibles : l'enzyme **FAAH** et les récepteurs **TRPV1/CB1**. Pour ceci, nous utiliserons **la technique de microinjection** pour valider le rôle de chacun des protagonistes clés dans l'effet antalgique du paracétamol évalué sur des tests de comportement adéquats (modalités thermiques et mécaniques).

III. Étude neurochimique d'une voie de signalisation cellulaire mise en jeu dans la substance grise périaqueducale

Les travaux précédents, concernant le substrat cérébral du paracétamol, ont mis en évidence une structure clé : **la SGPA**. Cette dernière, et plus particulièrement la partie ventrolatérale (vl-SGPA), est un **carrefour entre les voies ascendantes et les voies descendantes de la douleur** (Millan, 2002). Sa position stratégique en fait un relais dans la modulation de la douleur par les **voies**

descendantes sérotoninergiques. L'activité de la vl-SGPA dépend d'un **équilibre** entre un neurotransmetteur excitateur (**glutamate**) et un neurotransmetteur inhibiteur (**GABA, Figure 35**). De nombreuses voies de signalisations cellulaires peuvent être initiées dans la vl-SGPA pour moduler les contrôles descendants *via* cet équilibre (**1. Mécanismes cellulaires mis en jeu dans la modulation des contrôles descendants**). Plus particulièrement, il existe une voie endogène, régulièrement décrite, dont l'activation implique aussi bien le **système endocannabinoïdérique** que **vanilloïde**. En effet, plusieurs études montrent que le **mécanisme antinociceptif dû à l'activation des récepteurs TRPV1 pré-synaptiques** localisés dans la vl-SGPA est corrélé à une augmentation du glutamate et une diminution du GABA (Starowicz et al., 2007; Liao et al., 2011). Ce déséquilibre initié par l'augmentation du **relargage de glutamate** active une cascade dépendant du récepteur **mGLUR5** responsable de la synthèse d'un endocannabinoïde : le **2-AG**. Ce dernier, ayant une affinité pour les **récepteurs pré-synaptiques CB1** présents sur les **fibres GABAergiques**, diminue la libération de GABA inhibant ainsi le frein des voies descendantes. Ce déséquilibre en glutamate/GABA, ainsi que la cascade initiée, est largement décrit dans la littérature comme étant un mécanisme endogène de modulation de la douleur (Kano et al., 2009; Reisenberg et al., 2012; Hu et al., 2014), mais aussi une cible pharmacologique reconnue de certains opioïdes (Lloyd et al., 2007; Morgan et al., 2014; Wilson-Poe et al., 2014). Basés sur les observations précédentes, nous émettons l'hypothèse que **l'AM404 modifierait l'équilibre glutamate/GABA via les récepteurs TRPV1 et CB1, en faveur d'une activation des voies descendantes (Figure 35, Chiou et al., 2013).**

Notre **3^{ème} objectif** consistera donc à approfondir les **mécanismes cellulaires mis en jeu au niveau de la vl-SGPA**. Plus particulièrement, nous souhaitons comprendre si ces mécanismes cellulaires, explicités précédemment, peuvent être à l'origine de l'action du paracétamol *via* l'AM404 au niveau de la vl-SGPA. L'hypothèse du recrutement de cette cascade de signalisation cellulaire par l'AM404 issue du paracétamol sera confirmée par les deux étapes suivantes :

- Nous étudierons les variations de l'**équilibre glutamatergique/GABAergique dans la vl-SGPA**, après administration de paracétamol. Pour cela, nous utiliserons une technique non invasive de **spectrométrie RMN** chez le rat, afin de suivre les taux de glutamate et GABA.
- Nous confirmerons pharmacologiquement le rôle de cette voie de signalisation **mGLUR5-PLC-DAGL** par des **microinjections dans la vl-SGPA** d'inhibiteurs ou antagonistes de chacun des protagonistes de cette cascade. Nous pourrons ainsi évaluer les répercussions de ces inhibitions sur l'effet antalgique du paracétamol chez des animaux soumis aux tests d'immersion de la patte et de pression de la patte.

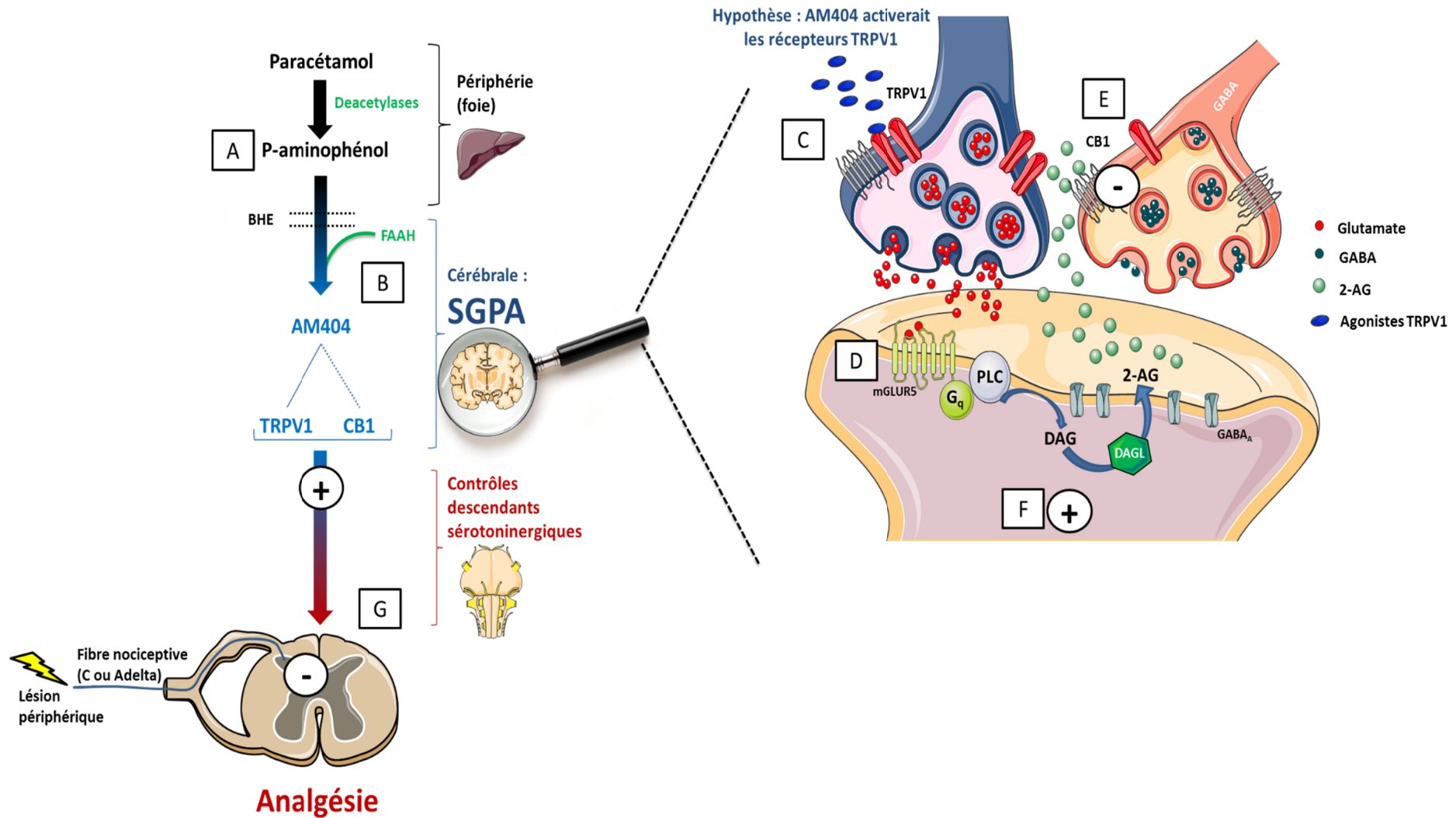


Figure 35. Hypothèse du mécanisme d'action centrale du paracétamol au niveau de la SGPA.

(A) Le p-aminophénol issu de la déacétylation hépatique du paracétamol, traverse la barrière hématoencéphalique (BHE). (B) La formation d'AM404 à partir du p-aminophénol est alors possible dans les régions exprimant l'enzyme FAAH, tel que la SGPA. (C) L'AM404 peut stimuler la libération de glutamate en activant les récepteurs pré-synaptiques des fibres glutamatergiques. (D) Le glutamate active les récepteurs mGLUR5 post-synaptique pour initier la voie de signalisation cellulaire PLC-DAGL-2-AG. (E) Le 2-AG ainsi synthétisé a un effet de rétrocontrôle négatif sur les fibres GABAergiques en limitant la libération de GABA. (F) Il y aurait ainsi une levée de l'inhibition GABAergique et (G) une activation des voies descendantes sérotoninergiques, produisant une inhibition du message nociceptif au niveau médullaire.

1^{ER} ARTICLE

*Supra-spinal FAAH is required for the analgesic
action of paracetamol in an inflammatory context*

Dalmann et al., 2014, *Neuropharmacology*

1. Synthèse du 1^{er} article

1. Introduction

Depuis les travaux d'Högestätt et al. (2005), les données concernant le mécanisme d'action antalgique du paracétamol font état d'un **bioprécurseur** dont le métabolite actif, l'**AM404**, serait formé au **niveau cérébral**. Dans cette séquence métabolique, une enzyme clé catalyse la formation de l'AM404 supra-spinal : la **FAAH** (Högestätt et al., 2005; Mallet et al., 2008a, 2010; Barrière et al., 2013). Une **inhibition pharmacologique** ou une **délétion génétique de cette enzyme** prévient à la fois la **formation d'AM404 centrale** (Högestätt et al., 2005) et l'**effet antalgique du paracétamol** (Mallet et al., 2008, 2010).

Ce mécanisme a été jusqu'à présent démontré au travers d'études précliniques *in vivo* chez l'animal sain, bien loin du contexte d'utilisation clinique du paracétamol. **Le 1^{er} objectif est donc de valider l'hypothèse du rôle stratégique de l'enzyme FAAH, dans le mécanisme d'action antalgique du paracétamol, en contexte pathologique.** Nous proposons pour cela d'étudier l'efficacité du paracétamol chez des souris avec ou sans délétion génétique de l'enzyme FAAH après induction d'une douleur inflammatoire localisée faisant suite à l'injection de carragénine i.pl.

Il est également important de noter que la **FAAH est une enzyme ubiquitaire** exprimée aussi bien en périphérie qu'au niveau central (Deutsch et al., 2002). De plus, des résultats présentés dans l'article de Ruggieri et al. (2008) ont démontré la **présence d'AM404 plasmatique** après une administration de paracétamol à forte dose chez le rat (400 mg/kg, i.p.). Ces données peuvent remettre en question les travaux d'Högestätt et al. (2005) décrivant une synthèse **exclusivement cérébrale d'AM404** issue du paracétamol et dépendante de l'enzyme FAAH. Devant ces contradictions, **le 2^{ème} objectif est de distinguer la part du rôle de l'enzyme localisée au niveau cérébral par rapport à sa distribution périphérique dans l'effet antalgique du paracétamol.** Basé sur les propriétés pharmacologiques de certains inhibiteurs spécifiques de l'enzyme FAAH ne passant pas la barrière hématoencéphalique (BHE) comme l'URB937 (Clapper et al., 2010), il est possible de bloquer sélectivement l'enzyme FAAH périphérique. Inversement, d'autres inhibiteurs tel que l'URB597 traversent la BHE neutralisant ainsi l'enzyme périphérique et centrale (Clapper et al., 2010). Grâce à cette stratégie pharmacologique originale, il est possible d'évaluer la contribution de l'enzyme FAAH cérébrale et/ou périphérique dans l'effet antalgique du paracétamol en condition pathologique.

2. Résultats

a. L'enzyme FAAH contribue, en contexte pathologique, à l'action antinociceptive du paracétamol

Le modèle de douleur inflammatoire employé consiste à induire au niveau de la patte une allodynie/hyperalgie thermique et mécanique par une injection i.pl. de carragénine à 3%. Le statut hypersensible est retrouvé chez les souris FAAH^{+/+} et chez les souris FAAH^{-/-}. Dans ces conditions, l'administration de paracétamol (200 mg/kg, p.o.) réduit l'hyperalgie et l'allodynie chez les animaux FAAH^{+/+} et ne présente aucun effet antalgique chez les souris FAAH^{-/-} (**Figure 37**). Ce résultat dénote **le rôle clé de l'enzyme FAAH dans l'action antalgique du paracétamol dans notre modèle de douleur inflammatoire.**

b. Implication strictement cérébrale de l'enzyme FAAH dans l'action antalgique du paracétamol en contexte pathologique

L'efficacité du paracétamol à réduire significativement l'allodynie et l'hyperalgie sur les tests d'immersion de la patte et de von Frey a été montrée dans les résultats présentés dans la **Figure 38** et la **Figure 39**. Toutefois, ces effets sont abolis par une administration préventive d'un inhibiteur de la FAAH centrale et périphérique, l'URB597 alors qu'ils sont conservés après administration préventive d'un inhibiteur dont l'efficacité est restreinte à la périphérie, l'URB937. Une contre-épreuve pour confirmer le rôle cérébral a été d'administrer directement au niveau supra-spinal par voie i.c.v. l'URB937, à savoir l'inhibiteur ne passant pas la barrière hématoencéphalique. Le potentiel anti-allodynique et anti-hyperalgique du paracétamol sur ces deux modalités de douleur est alors perdu (**Figure 40**). Ainsi, ces données démontrent que **seule l'enzyme FAAH cérébrale est requise pour l'effet antalgique du paracétamol.**

3. Conclusion et discussion

Les résultats décrits précédemment ont apporté deux informations essentielles concernant le mécanisme d'action antalgique du paracétamol :

- 1- Le concept de promédicament à effet central, suivant une biotransformation *via* l'enzyme FAAH, est conservé **en condition pathologique dans le modèle utilisé de douleur inflammatoire induite à la carragénine.**
- 2- L'effet antalgique du paracétamol **dépend exclusivement de l'enzyme FAAH cérébrale.**

Ainsi, plusieurs points essentiels abordés dans cet article sont discutés. Entre autres, le rôle de l'enzyme FAAH dans l'action antalgique du paracétamol peut-il être à l'origine des autres effets pharmacologiques du paracétamol ? Il est également intéressant d'aborder les effets intrinsèques sur la douleur d'une délétion ou d'une inhibition de l'enzyme FAAH.

a. Rôle de l'enzyme FAAH dans les différents effets pharmacologiques du paracétamol

Nos études ont à plusieurs reprises montré l'intérêt de l'enzyme FAAH dans l'action antalgique du paracétamol (Mallet et al., 2008, 2010) (et de son métabolite intermédiaire, le p-aminophénol, Barrière et al., 2013). Une délétion génétique (Mallet et al., 2010) ou une inhibition de la FAAH par l'administration systémique de PMSF et d'URB597 (Mallet et al., 2008) bloque le potentiel antinociceptif du paracétamol sur le test au formol. Notre article apporte ici une preuve supplémentaire quant au rôle de cette enzyme dans l'efficacité antalgique du paracétamol, et ceci **en condition pathologique**.

Néanmoins, dans un modèle de douleur viscérale, induit par une administration d'acide acétique par la voie i.p., aucun lien entre l'inhibition de l'enzyme FAAH et l'effet antinociceptif du paracétamol n'est établi (Soukupová et al., 2010). Il faut savoir que l'utilisation du paracétamol dans la douleur viscérale n'est pas particulièrement recommandée (Spiller et al., 2007; American College of Gastroenterology Task Force on Irritable Bowel Syndrome et al., 2009). De plus, l'utilisation du test des crampes abdominales induites par l'acide acétique n'est pas reconnue comme très spécifique des douleurs viscérales puisque certains agents non analgésiques montrent un effet antinociceptif sur ce test (Bars et al., 2001).

Le rôle de la FAAH a également été étudié dans d'autres effets pharmacologiques décrits du paracétamol :

- Il semble que le paracétamol produit des effets anxiolytiques dépendant de l'enzyme FAAH puisqu'une co-administration avec l'URB597 réduit ces propriétés (Zaitone et al., 2012).
- Le paracétamol est également doté d'un effet hypothermisant, mais dans ce cas une inhibition de l'enzyme FAAH n'altère pas la diminution de la température corporelle (Ayoub et al., 2011). Cela sous-entend que l'effet hypothermisant du paracétamol impliquerait une autre voie indépendamment de l'enzyme FAAH.

Ainsi, la biotransformation du paracétamol *via* l'enzyme FAAH n'explique pas à elle seule tous les effets pharmacologiques de ce produit. Néanmoins, dans son indication principale comme antalgique, cette voie mécanistique avec l'enzyme FAAH semble impliquée et pertinente.

b. Délétion génétique de l'enzyme FAAH : entre phénotype hypoalgique et inhibition de l'effet antalgique du paracétamol

Les études portant sur les souris FAAH^{-/-} sont souvent assimilées au phénotype hypoalgique de ces animaux. Or, nos résultats ne retrouvent aucune hypoalgie sur nos tests de douleur thermique et mécanique. Il est noté une hypoalgie thermique des souris FAAH^{-/-} sur les tests de la plaque chaude et d'immersion de la queue pour des températures élevées et supérieures à 54°C (Cravatt et al., 2001, 2004; Lichtman et al., 2004). Toutefois, ces mêmes articles ne retrouvent pas de différence de sensibilité entre les deux génotypes aux températures inférieures à 54°C. Une comparaison des réponses concernant le versant mécanique entre les souris FAAH^{+/+} et FAAH^{-/-} n'a pas encore été exploré chez la souris sans modèle de douleur. Un seul article évalue les seuils de base sur un test de von Frey manuel entre des souris FAAH^{-/-} et sauvages, et aucune différence n'est observée entre les deux génotypes (Chang et al., 2006). Il s'avère donc que le phénotype hypoalgique des souris FAAH^{-/-} est dépendant de la nature et de l'intensité du *stimulus* douloureux.

Nos données montrent en effet que faire varier l'intensité et la nature du *stimulus* douloureux permet d'afficher le caractère hypoalgique de ces souris. Pour s'affranchir des variations intrinsèques des seuils de douleurs chez les FAAH^{-/-}, pouvant masquer les effets antalgiques du paracétamol, nous avons souhaité opter pour un contexte où la sensibilité nociceptive thermique était similaire entre les deux génotypes. De même pour la modalité mécanique, nous avons fait le choix de se rapprocher de la procédure expérimentale de Chang et al. (2006) avec une méthode manuelle du von Frey. Dans notre cas, nous avons évalué la réponse des animaux à un filament de force constante induisant soit une allodynie (filament produisant une force de 0,04 g) soit une hyperalgie (filaments de 0,6 et 1,4 g).

Un autre point, concernant l'hyposensibilité des souris FAAH^{-/-} à la douleur dans certains modèles pathologiques, peut être discuté. De nombreux articles relatent ce phénomène dans différents modèles tel que l'arthrite induite par injection de collagène (Kinsey et al., 2011) ou l'inflammation par administration plantaire de lipopolysaccharides (LPS, Naidu et al., 2010; Booker et al., 2012). Dans d'autres modèles tels que les douleurs neuropathiques, aucune atténuation de l'hyperalgie induite n'est retrouvée (Lichtman et al., 2004; Kinsey et al., 2009). Un article a étudié l'impact d'une délétion génétique de l'enzyme FAAH après un modèle inflammatoire par administration i.pl. de carragénine sur le test de la plaque chaude (Lichtman et al., 2004). Cependant, aucune donnée bibliographique ne fait état d'une hypoalgie des souris FAAH^{-/-} dans nos conditions expérimentales.

En résumé, nos conditions expérimentales ont permis d'étudier l'impact d'une délétion de l'enzyme FAAH sur l'action antalgique du paracétamol en condition pathologique, en s'affranchissant des effets intrinsèques sur la douleur du génotype KO.

c. Effets antalgiques intrinsèques des inhibiteurs de l'enzyme FAAH

Notre deuxième objectif s'est appuyé sur les caractéristiques physico-chimiques d'inhibiteurs de l'enzyme FAAH passant ou non la BHE, pour **distinguer l'importance de l'enzyme FAAH strictement cérébrale dans le mécanisme d'action antalgique du paracétamol**. Il ne faut cependant pas négliger le caractère antinociceptif intrinsèque reconnu des inhibiteurs de l'enzyme FAAH (Kano et al., 2009; Lau et al., 2014).

En effet, cette enzyme a notamment un rôle dans la dégradation de l'anandamide et du 2-AG. Une inhibition de la FAAH induit alors une accumulation de ces derniers potentialisant le système endocannabinoïde et ses effets sur la nociception (Lichtman et al., 2002; Kano et al., 2009; Luchicchi et Pistis, 2012). Souvent employés à des doses comprises entre 1 et 10 mg/kg, ces deux inhibiteurs URB597 et URB937 ont une efficacité non négligeable pour soulager diverses douleurs (Costa et al., 2010; Moreno-Sanz et al., 2012). Nous avons d'ailleurs eu l'occasion d'apprécier cet effet dans nos expérimentations lors de la réalisation d'une courbe effet dose. Ainsi, nous avons déterminé une dose de 0,3 mg/kg qui permet de s'affranchir des effets antinociceptifs intrinsèques de ces inhibiteurs pharmacologiques, tout en conservant une inhibition de l'enzyme FAAH (Clapper et al., 2010). Il faut cependant nuancer ces propos, car à cette dose certains articles leur reconnaissent un effet antalgique, mais sur des modèles ou des tests différents de ceux employés dans notre étude (Jayamanne et al., 2006; Sasso et al., 2012).

En conclusion, nos résultats obtenus dans cet article distinguent bien **le rôle clé de l'enzyme FAAH cérébrale** contrairement à son homologue situé en périphérie, justifiant par la même occasion qu'une éventuelle synthèse d'AM404 périphérique résultant d'une administration de paracétamol à dose élevée ne serait donc pas corrélée à son effet antinociceptif. Ainsi, ces données apportent une preuve supplémentaire que le paracétamol répond à la définition d'un promédicament dont l'efficacité en condition pathologique dépend d'une action cérébrale.

Supra-spinal FAAH is required for the analgesic action of paracetamol in an inflammatory context

Romain Dalmann^{a,b}, Laurence Daulhac^{a,b}, Myriam^{b,d} Antri, Alain Eschalier^{a,b,c} and Christophe Mallet^{a,b}

- (a) Clermont Université, Université d'Auvergne, Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur, Clermont-Ferrand, France.
- (b) Inserm, U 1107, NEURO-DOL, Clermont-Ferrand, France.
- (c) CHU Clermont-Ferrand, Service de Pharmacologie, Clermont-Ferrand, France
- (d) Clermont Université, Université d'Auvergne, Douleur Trigéminal et Migraine, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

II. Introduction

Despite the fact that paracetamol is the irreplaceable over-the-counter analgesic, its cellular and molecular action remains poorly understood (Mallet and Eschalier, 2010). Recently, a new idea emerged that considered paracetamol as a pro-drug needed to be biotransformed by a two-steps metabolism (Högestätt et al., 2005). The first step consists in a hepatic deacetylation of paracetamol into para-aminophenol. The second step is the conjugation of para-aminophenol with arachidonic acid by the Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) enzyme into AM404. The key role of FAAH has been highlighted by the demonstration that inhibition of this key enzyme by a genetic strategy (FAAH knockout mice) or a pharmacological approach (administration of PMSF, a FAAH inhibitor) suppressed the synthesis of AM404 after a systemic paracetamol administration (Högestätt et al., 2005). This metabolic pathway, especially the FAAH enzyme, have been shown to be crucial for the analgesic action of paracetamol (Mallet et al., 2008, 2010; Barrière et al., 2013). However, these studies were conducted in naive animals. In the clinical setting, paracetamol is used in a pathological pain context, notably in nociceptive pain (Wegman et al., 2004; Altman et al., 2007). Different mechanisms may underlie the analgesic action of paracetamol depending upon the pain context. For example, we highlighted that different spinal serotonergic receptors were involved in paracetamol analgesia according to the nature of the noxious *stimulus* (Bonfont et al., 2005). In different models of acute visceral pain in mice, Haller et al. (2006) and Soukupova et al. (2010) did not demonstrate a FAAH-dependent analgesic mechanism. Consequently, the first purpose of this paper was to study the involvement of FAAH on paracetamol action in a more relevant clinical context using an inflammatory mouse model submitted to thermal and mechanical *stimuli* to assess

hyperalgesia. Genetic and pharmacological strategies were used to inhibit FAAH and to assess its involvement in the anti-hyperalgesic effect of paracetamol.

The site of paracetamol action remains controversial. Some publications are in favor of a central action (Pickering et al., 2006; Mallet et al., 2010; Dogrul et al., 2012a; Barrière et al., 2013), while others report a peripheral action (Ferreira et al., 1978; Dani et al., 2007). FAAH is a ubiquitous enzyme (Deutsch et al., 2002); therefore, after systemic paracetamol administration, AM404 can be formed in the central nervous system (Högestätt et al., 2005; Mallet et al., 2010; Barrière et al., 2013) and in the periphery, especially in blood (Ruggieri et al., 2008). The FAAH inhibition performed in previous experiments by genetic or pharmacological tools was systemic. Thus, the contribution of peripheral versus central involvement of FAAH was indistinguishable. We addressed this issue by challenging the effect of paracetamol after a systemic administration of specific FAAH inhibitors URB597 or URB937. In contrast to URB597, which reaches the brain, URB937 cannot cross the blood-brain barrier (Clapper et al., 2010; Moreno-Sanz et al., 2011). A dose of URB compounds that inhibited FAAH (Clapper et al., 2010) without affecting inflammatory pain thresholds in our conditions was first investigated. The comparison of the impact of brain-permeant (URB597) and brain-impermeant (URB937) FAAH inhibitors on paracetamol effect will identify the respective involvement of central and/or peripheral FAAH in paracetamol action.

III. Materials and methods

All experiments conformed to the guidelines of the Committee for Research and Ethical Issues of IASP (Zimmermann, 1983) and approved by our regional ethics committee for animal experiments of the Auvergne region in France (CEMEA Auvergne; CEEA-02). Pharmacological experiments were carried out using male C57BL6/J mice (20-24 g) obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). Wild type littermate (FAAH^{+/+}) and FAAH-deficient (FAAH^{-/-}) C57BL/6 mice were used in other experiments. FAAH-deficient mice, originally generated by Benjamin Cravatt (2001) were bred in the animal house. The FAAH genotype of genitors was confirmed by PCR. The purchased animals were housed for one week prior starting the experiments in order to acclimatize them and they were kept under standard conditions (21-22°C; 12/12h light/dark cycle; 55% humidity) with food and water *ad libitum*.

1. Drugs

λ-Carrageenan and paracetamol (Sigma-Aldrich, Lyon, France). 3'-Carbamoyl-biphenyl-3-yl-cyclohexylcarbamate (URB597, Cayman Chemical, Michigan, USA) and 3'-carbamoyl-6-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-ylcyclohexylcarbamate (URB937, Cayman Chemical, Michigan, USA). λ-Carrageenan 3%

was dissolved in a NaCl 0.9% solution. Paracetamol was prepared in a saline solution of NaCl 0.9% and kept stirred. URB597 and URB937 were dissolved in DMSO/saline (1:9). Drug solutions were prepared immediately before use.

2. Intracerebroventricular injection

The intracerebroventricular (i.c.v.) administration was performed following the method described by Haley and McCormick (1957). Animals were briefly anaesthetized under isoflurane (1–2%). The site of injection was 2 mm from either side of the median on a line drawn through the anterior base of the ears. Animals were injected with a 10 μ L Hamilton syringe fitted with a 26-gauge needle with the tip adjusted to be inserted 2 mm deep. The i.c.v. injection volume was 5 μ L.

3. Model of inflammation

On the day of the experiment, paw inflammation was induced by an intraplantar (right hindpaw) subcutaneous injection of 20 μ L of 3% λ -carrageenan, using a 50 μ L Hamilton syringe and a 26-gauge needle. Comparison of the reaction threshold was performed before and four hours following intraplantar injection of λ -carrageenan to ensure mice exhibited “pain”-related behavior (Morris, 2003).

4. Behavioral tests

a. Paw immersion

In the paw immersion test, the right hindpaw of the mouse was immersed in a water bath maintained at different temperatures, from 46°C to 54°C as described previously (Lolignier et al., 2011). Latency time of withdrawal, measured in seconds (s) with a cut-off time of 15 s to avoid injury, was used as a “pain” parameter. Animals were previously habituated to handling for the behavioral testing. On the day of the experiment, three consecutive withdrawal latencies were averaged (with an interval of at least 15 min between two measures) and considered as pre-treatment values.

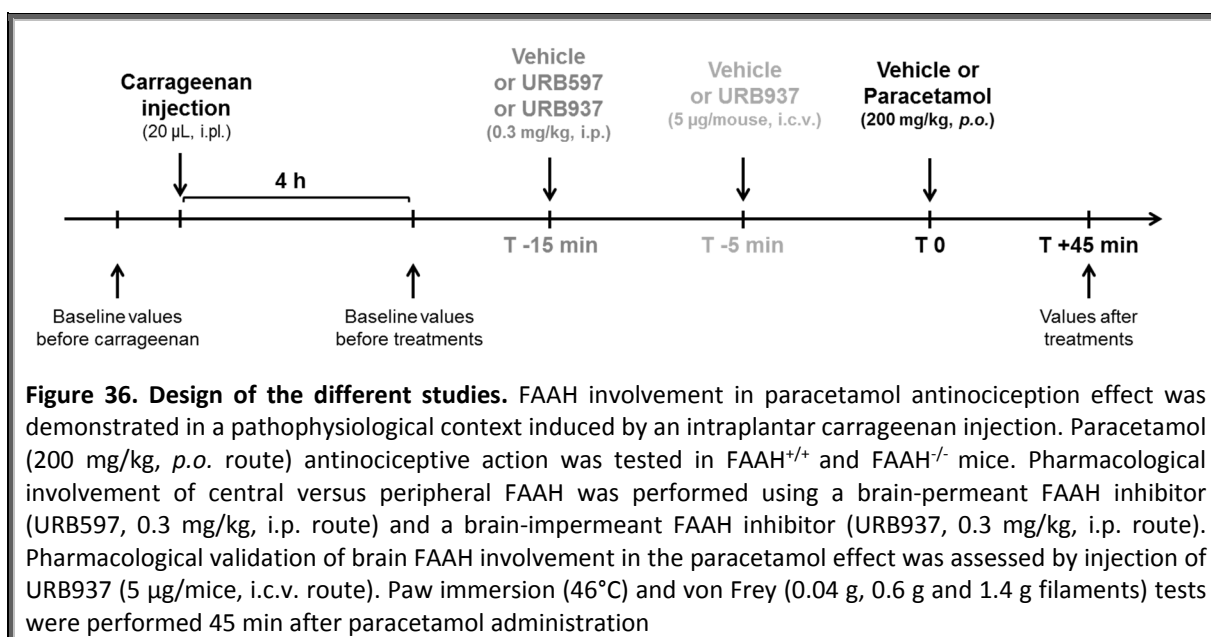
b. von Frey test

Animals were placed in Plexiglas boxes with compartments on elevated wire mesh platforms to allow access to the ventral surface of the right hindpaw. Animals were acclimatized for 120 min the day prior to behavioral testing and for at least 30 min before behavior assessment. Three calibrated von Frey filaments producing a force of 0.04 g, 0.6 g and 1.4 g (Bioseb, France) were used to test mechanical sensitivity in mice as described previously (Descoeur et al., 2011). Allodynia was tested with the 0.04 g filament, which was a non-noxious mechanical *stimulus* in healthy animals,

and hyperalgesia was measured with 0.6 g and 1.4 g filaments. Filaments were applied five times in the order of increasing stiffness, perpendicularly to the plantar surface of the hindpaw and pressed until they bent. The number of paw withdrawal responses (PWR) for a given filament force was counted and used as a “pain” parameter.

c. Experimental protocol

The design, analysis and reporting of the research were carried out according to the ARRIVE guidelines. Animals were randomly divided into 8-10 mice per group. Treatment administrations were performed according to the method of equal blocks, in order to assess the effect of the different treatments at the same time interval to avoid unverifiable and time-variable environmental influences. All experiments were performed in a quiet room by the same blinded experimenter. To ensure the methodological quality of this study, details are reported in **supplementary data 1 (Figure 41)** as recommended by Rice et al. (2008a). On the day of the experiment, behavioral reactions were assessed before and after carrageenan injection to ensure that mice exhibited inflammation-related allodynia or hyperalgesia (Morris, 2003). A summary of the experimental protocols is depicted in **Figure 36**.



Based on previous studies, the dose of 200 mg/kg of paracetamol (orally administered 4h after carrageenan) was chosen because it produced robust responses in nociceptive tests without impairing motor activity (Mallet et al., 2008, 2010). The design of this study was structured as follows: (1) Assessment of the FAAH enzyme requirement in paracetamol action in an inflammatory pain model. Thermal and mechanical modalities were used to evaluate the effect of paracetamol in FAAH^{-/-} and FAAH^{+/+} mice. (2) We specifically examined the involvement of central versus peripheral

FAAH in an inflammatory pain context, using two different FAAH inhibitors: brain-permeant (URB597) and brain-impermeant (URB937). The two compounds were injected at 0.3 mg/kg i.p. route, 15 min before paracetamol administration (Clapper et al., 2010). (3) Validation of brain FAAH involvement in paracetamol effects using an intracerebroventricular (i.c.v.) injection of the peripherally-restricted FAAH inhibitor URB937 (5 µg/mouse), 5 min before paracetamol administration. In each experimental group, behavioral tests were performed 45 min after randomized paracetamol or vehicle administration.

5. Statistical analysis

Results are expressed as the mean ± standard deviation (S.D.). Multiple measurements were compared by one-way or two-way analysis of variance or by the Kruskal-Wallis test in the case of data that were not normally distributed. Dose effects of URB compounds were compared performing one way ANOVA in the paw immersion test, and the Kruskal Wallis test was used in the von Frey test. The post hoc comparisons were performed by the Tukey method. The thermal hyperalgesia and the mechanical allodynia/hyperalgesia induced by intraplantar carrageenan injection was compared to values obtained before carrageenan injection (healthy rat), using a two-way ANOVA repeated measures followed by the corresponding Tukey post-test. In the same way, comparisons between before treatment and after treatment as well as between different treatment groups were carried out using the two-way ANOVA repeated measure, followed by the Tukey post-test. Results were considered to be significant if the *P* value was less than 0.05. Statistical analysis was performed by Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

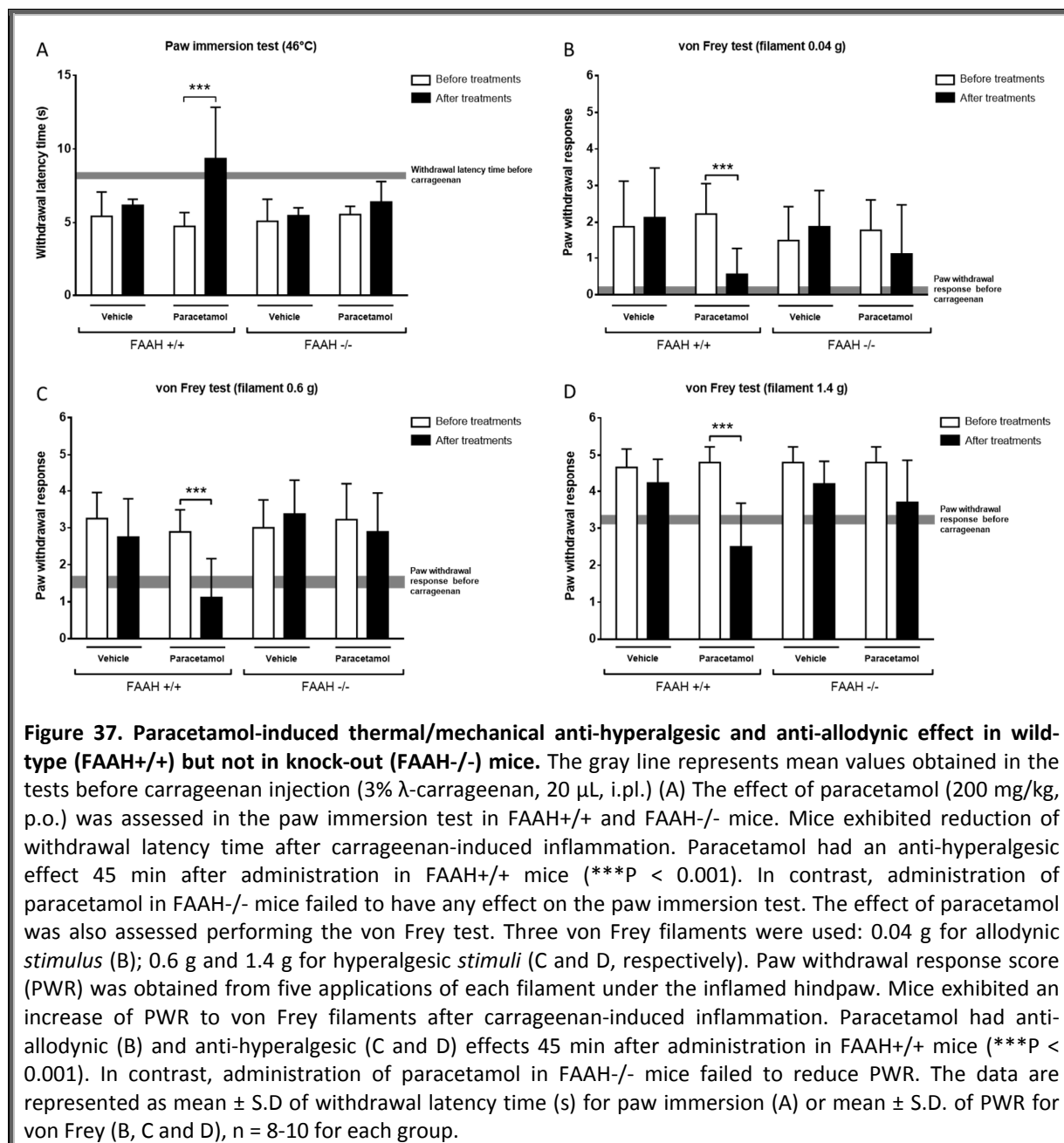
1. Results

1. Requirement of the FAAH enzyme in paracetamol action in an inflammatory pain context

The involvement of the FAAH enzyme in the action of paracetamol was explored by comparing its analgesic effect in knock-out (FAAH^{-/-}) mice and their wild-type (FAAH^{+/+}) littermates. We preliminarily showed, in a naive context, that naïve FAAH^{+/+} and FAAH^{-/-} mice submitted to the paw immersion test presented a difference in pain perception at high temperatures (Supplementary data 2, **Figure 42**), revealing the hypoalgesic phenotype of the FAAH^{-/-} mice. A temperature of 46°C was chosen in subsequent experiments to avoid this latter phenotype. At this temperature, the withdrawal latency time mean for FAAH^{-/-} and FAAH^{+/+} animals was decreased significantly after carrageenan injection from 8.3 ± 0.5 s to 5.2 ± 0.4 s, $P < 0.001$, demonstrating the thermal hyperalgesic status of the animals (**Figure 37A**). Administration of paracetamol significantly reduced thermal hyperalgesia from 4.7 ± 0.9 s to 9.4 ± 3.5 s ($P < 0.001$) in FAAH^{+/+} mice. In FAAH^{-/-} mice, paracetamol was ineffective; no significant difference was observed before (5.5 ± 0.6 s) or after (6.4 ± 1.4 s) paracetamol treatment.

Carrageenan-induced mechanical allodynia/hyperalgesia was also assessed in the von Frey test. After carrageenan injection, the number of paw withdrawal responses (PWR) to each filament application was significantly increased from 0.1 ± 0.1 to 1.8 ± 0.3 ($P < 0.001$), from 1.6 ± 0.5 to 3.1 ± 0.2 ($P < 0.001$) and from 3.3 ± 0.1 to 4.8 ± 0.1 ($P < 0.001$) for 0.04 g, 0.6 g and 1.4 g von Frey filaments, respectively (**Figure 37**). In FAAH^{+/+} mice, administration of paracetamol produced robust anti-allodynic (decrease in the number of PWR from 2.2 ± 0.8 to 0.6 ± 0.7 for the 0.04 g filament, $P < 0.001$, **Figure 37B**) and anti-hyperalgesic effects (from 2.9 ± 0.6 PWR to 1.1 ± 1.1 PWR for the 0.6 g filament and from 4.8 ± 0.14 PWR to 2.5 ± 1.2 PWR for the 1.4 g filament, **Figure 37C and D**, respectively). However, in FAAH^{-/-} mice, paracetamol reversed neither the allodynia (**Figure 37B**) nor hyperalgesia (**Figure 37C and D**) induced by carrageenan injection.

Altogether, these results demonstrate the necessity of the FAAH enzyme in paracetamol action in an inflammatory pain context.



2. Central but not peripheral FAAH is needed for the analgesic action of paracetamol

Central versus peripheral contribution of FAAH in paracetamol action was explored using two pharmacological tools: a FAAH inhibitor that readily crosses the blood-brain barrier (URB597), and a peripherally-restricted FAAH inhibitor (URB937, Clapper et al., 2010; Moreno-Sanz et al., 2011). The effect of paracetamol on inflammatory pain was challenged with a co-administration of 0.3 mg/kg of each URB compound. The dose of 0.3 mg/kg was used because (1) it does not modify pain thresholds in the inflammatory context (**Supplementary data 3, Figure 43**) and (2) it readily inhibits peripheral and central FAAH for URB597 and only peripheral FAAH for URB937 (Clapper et al., 2010).

In the paw immersion test, as in the previous experiments, injection of carrageenan produced thermal hyperalgesia demonstrated by a decreased withdrawal latency time from 7.6 ± 0.5 s to 4.8 ± 0.4 s. Paracetamol treatment counteracted this effect, increasing the withdrawal latency time (10.2 ± 3.7 s). However, such an anti-hyperalgesic effect was reduced when URB597 (0.3 mg/kg) was injected before paracetamol (6.9 ± 2.7 s, $P < 0.01$). In contrast, pre-treatment with URB937 at the same dose failed to reverse the analgesia induced by paracetamol (10.2 ± 2.6 s, **Figure 38**).

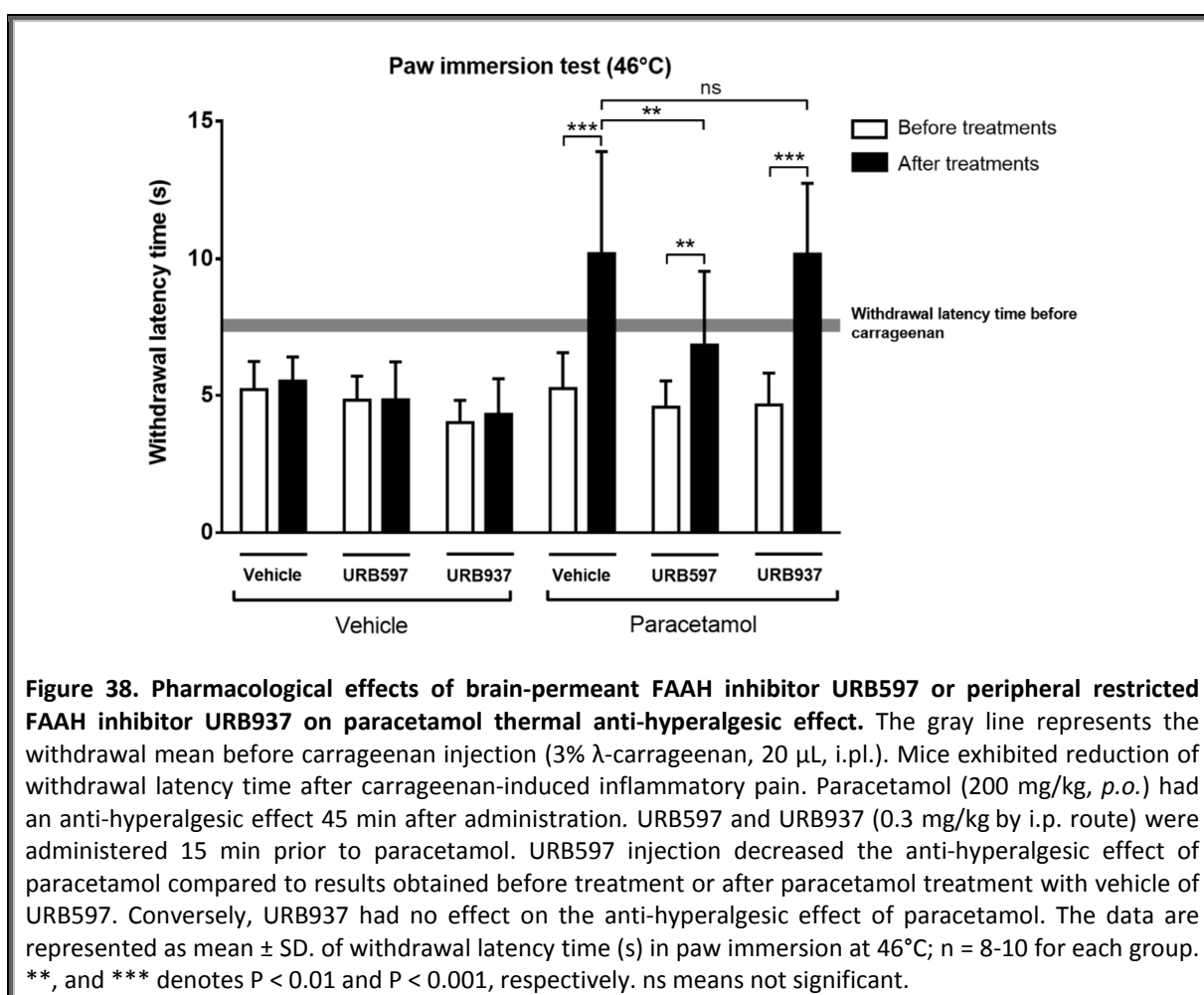


Figure 38. Pharmacological effects of brain-permeant FAAH inhibitor URB597 or peripheral restricted FAAH inhibitor URB937 on paracetamol thermal anti-hyperalgesic effect. The gray line represents the withdrawal mean before carrageenan injection (3% λ -carrageenan, 20 μ L, i.pl.). Mice exhibited reduction of withdrawal latency time after carrageenan-induced inflammatory pain. Paracetamol (200 mg/kg, *p.o.*) had an anti-hyperalgesic effect 45 min after administration. URB597 and URB937 (0.3 mg/kg by i.p. route) were administered 15 min prior to paracetamol. URB597 injection decreased the anti-hyperalgesic effect of paracetamol compared to results obtained before treatment or after paracetamol treatment with vehicle of URB597. Conversely, URB937 had no effect on the anti-hyperalgesic effect of paracetamol. The data are represented as mean \pm SD. of withdrawal latency time (s) in paw immersion at 46°C; $n = 8-10$ for each group. **, and *** denotes $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively. ns means not significant.

In the von Frey test, paracetamol-induced anti-allodynia (PWR score decreased from 2.4 ± 0.5 to 0.4 ± 0.5 , $P < 0.001$, **Figure 39A**) and anti-hyperalgesia (from 4.0 ± 0.8 to 1.6 ± 1.4 , $P < 0.001$ and from 5.0 ± 0.1 to 2.2 ± 2.0 , $P < 0.001$ for 0.6 and 1.4 g filaments, respectively, **Figure 39B** and **C**) were reduced or suppressed by URB597. However, the brain-impermeant FAAH inhibitor (URB937) did not alter these effects (**Figure 39**).

These results pharmacologically confirmed the involvement of FAAH and demonstrated that only the central FAAH enzyme is required for paracetamol-induced analgesia.

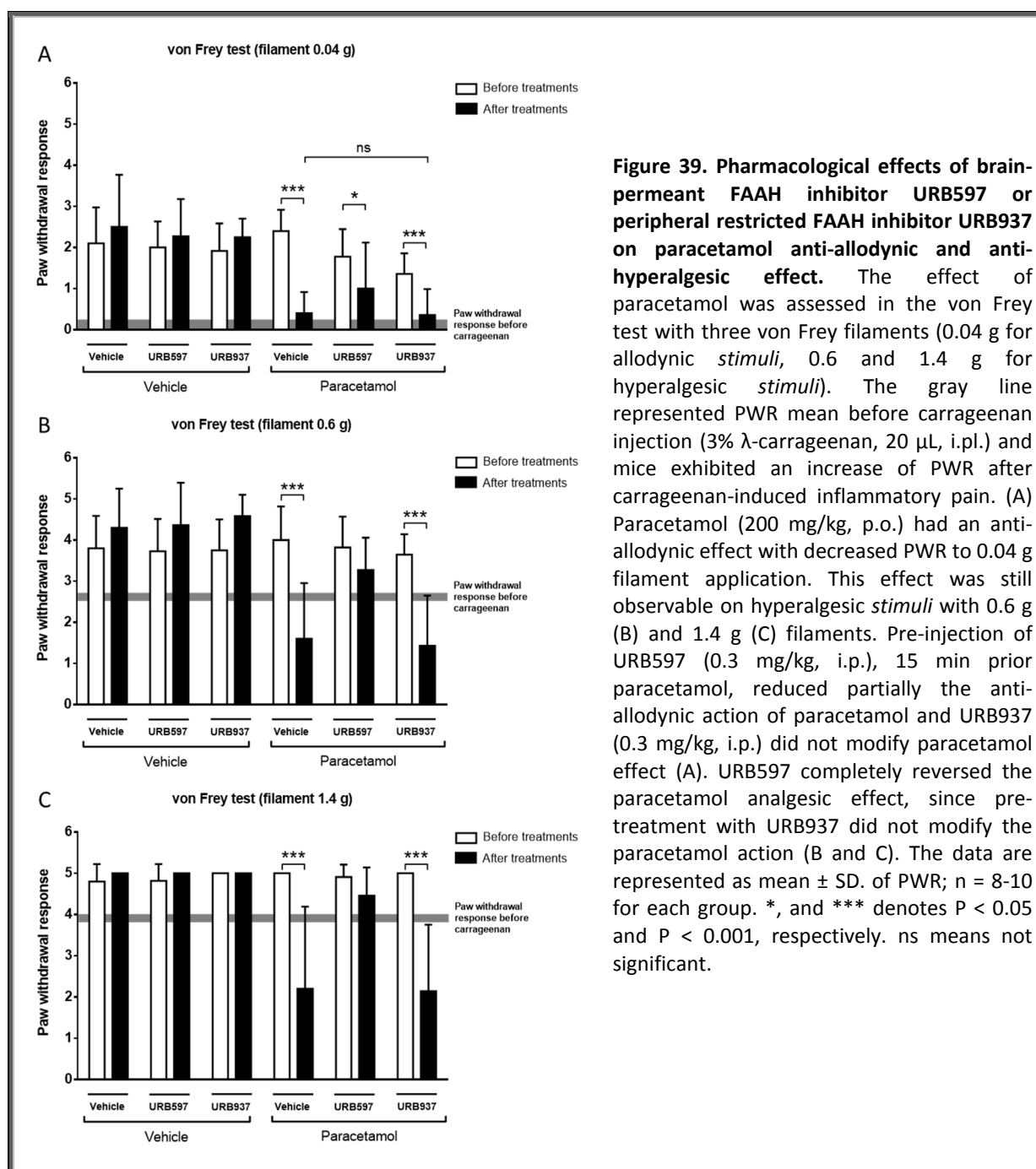


Figure 39. Pharmacological effects of brain-permeant FAAH inhibitor URB597 or peripheral restricted FAAH inhibitor URB937 on paracetamol anti-allodynic and anti-hyperalgesic effect. The effect of paracetamol was assessed in the von Frey test with three von Frey filaments (0.04 g for allodynic *stimuli*, 0.6 and 1.4 g for hyperalgesic *stimuli*). The gray line represented PWR mean before carrageenan injection (3% λ -carrageenan, 20 μ L, i.p.) and mice exhibited an increase of PWR after carrageenan-induced inflammatory pain. (A) Paracetamol (200 mg/kg, p.o.) had an anti-allodynic effect with decreased PWR to 0.04 g filament application. This effect was still observable on hyperalgesic *stimuli* with 0.6 g (B) and 1.4 g (C) filaments. Pre-injection of URB597 (0.3 mg/kg, i.p.), 15 min prior paracetamol, reduced partially the anti-allodynic action of paracetamol and URB937 (0.3 mg/kg, i.p.) did not modify paracetamol effect (A). URB597 completely reversed the paracetamol analgesic effect, since pre-treatment with URB937 did not modify the paracetamol action (B and C). The data are represented as mean \pm SD. of PWR; n = 8-10 for each group. *, and *** denotes $P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively. ns means not significant.

3. Supra-spinal FAAH is the key enzyme for paracetamol action

To confirm the central site of action of paracetamol and especially the involvement of supra-spinal FAAH, the peripherally-restricted FAAH inhibitor URB937 (5 μ g/mouse) was injected by the i.c.v. route before paracetamol. In the paw immersion test, Tukey's *post hoc* analysis showed that paracetamol induced a thermal anti-hyperalgesic effect, increasing the withdrawal latency time from 3.6 ± 0.5 s to 10.3 ± 4.4 s ($P < 0.001$, **Figure 40A**). Mice treated by a supra-spinal injection of URB937 prior to paracetamol treatment exhibited a reduced analgesic effect of paracetamol (**Figure 40A**).

In the mechanical modality, as previously shown, the number of PWR obtained after carrageenan injection (2.9 ± 0.1 PWR, 4.0 ± 0.1 PWR, 4.9 ± 0.1 PWR for 0.04 g, 0.6 g, 1.4 g filaments, respectively, **Figure 40B, C and D**) were significantly decreased by paracetamol (0.9 ± 1.2 PWR, 2.4 ± 1.4 PWR and 3.3 ± 1.2 PWR for 0.04 g, 0.6 g, 1.4 g filaments, respectively, **Figure 40B, C and D**). Performing i.c.v. injection of URB937 prior to paracetamol totally reversed its anti-allodynic and anti-hyperalgesic actions. Indeed, the PWR scores obtained were not statistically different from those of corresponding pre-treatment control groups (2.1 ± 1.1 PWR for 0.04 g filament, **Figure 40B**, 4.2 ± 0.6 PWR and 4.7 ± 0.5 PWR for 0.6 g and 1.4 g filaments, respectively, **Figure 40C and D**).

All of these results demonstrate that supra-spinal FAAH is required for the desired effect of paracetamol.

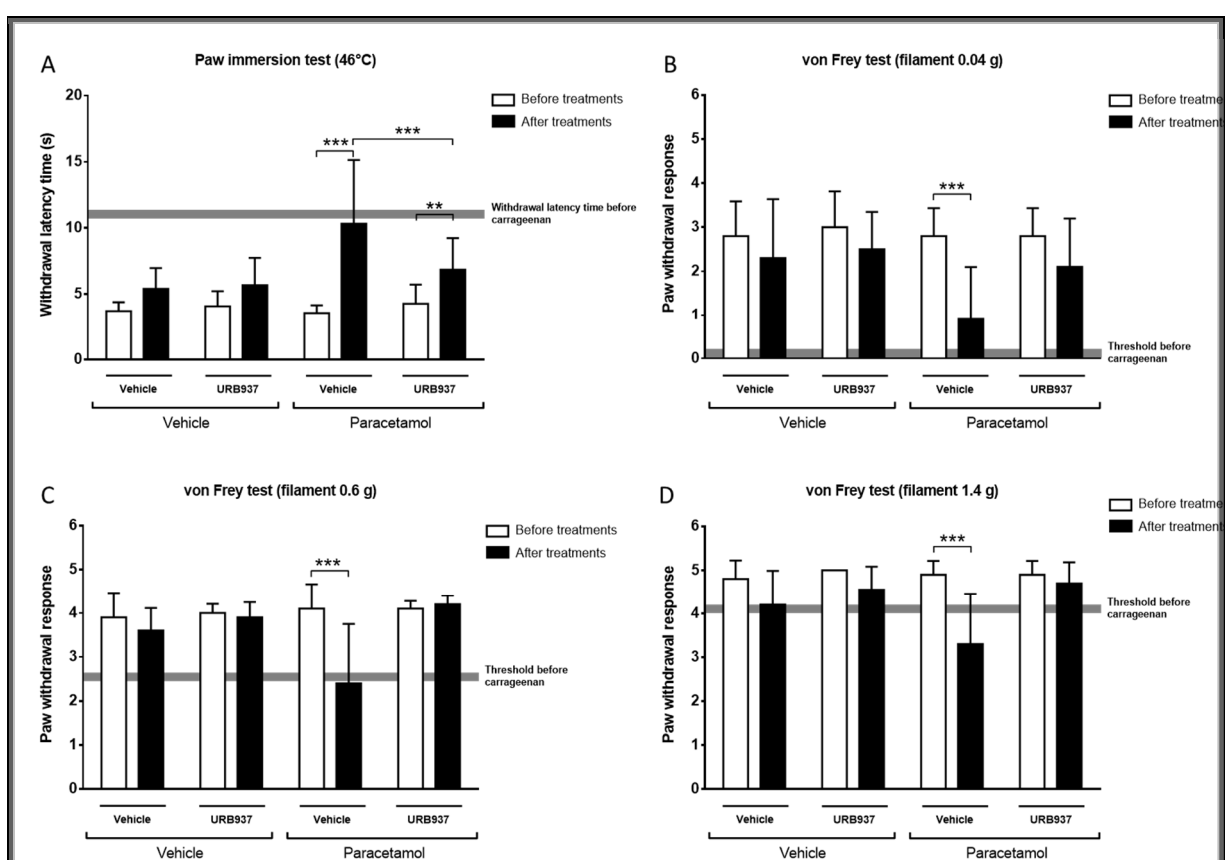


Figure 40. Pharmacological validation of FAAH brain involvement in paracetamol anti-hyperalgesic and anti-hyperalgesic effects via brain injection of peripheral FAAH inhibitor URB937. The effect of paracetamol (200 mg/kg, p.o.) was assessed in the paw immersion and von Frey tests. The gray line represents the threshold mean before carrageenan injection (3% λ -carrageenan, 20 μ L, i.pl.). Withdrawal latency times (A) and PWR (B, C and D) after carrageenan-induced inflammatory pain were reduced. Paracetamol increased response latency in the paw immersion test (A), and decrease the PWR (B, C and D). These effects were prevented by a prior brain injection of the peripheral FAAH inhibitor URB937 (5 μ g/mice, i.c.v. route) 5 min before paracetamol administration. The data are represented as mean \pm S.D. of withdrawal latency time (s) for paw immersion at 46°C (A), or mean \pm S.D. of PWR for each von Frey filament (B, C and D); n = 8-10 for each group. ** and *** denotes $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively.

4. Supplementary Data

Extended Methods Form

Rice ASC, Cimino-Brown D, Eisenach JC, Kontinen VK, LaCroix-Fralish ML, Machin I, Mogil JS, Stöhr T. Animal models and the prediction of efficacy in clinical trials of analgesic drugs: a critical appraisal and call for uniform reporting standards. *Pain* 2008;139(2):241-5

1. Experimental design

Experiments blinded	Yes
- what	Drug Condition
- how	Observers unaware of treatment
Randomization	Yes
Power calculation	Yes
How many data points removed?	1-5
- why	If the value exceeds $\pm 2SD$

2. Animals

Age	Young Adult
Sex	Male
Genetic background of mutation	Mice strain: C57BL/6
Supplier	Charles River, Italy
Weight Range	20-30 g
Behavioral Abnormalities	None
Any additional comments	KO mice were initially generated by B. Cravatt

3. Environment

a. Housing

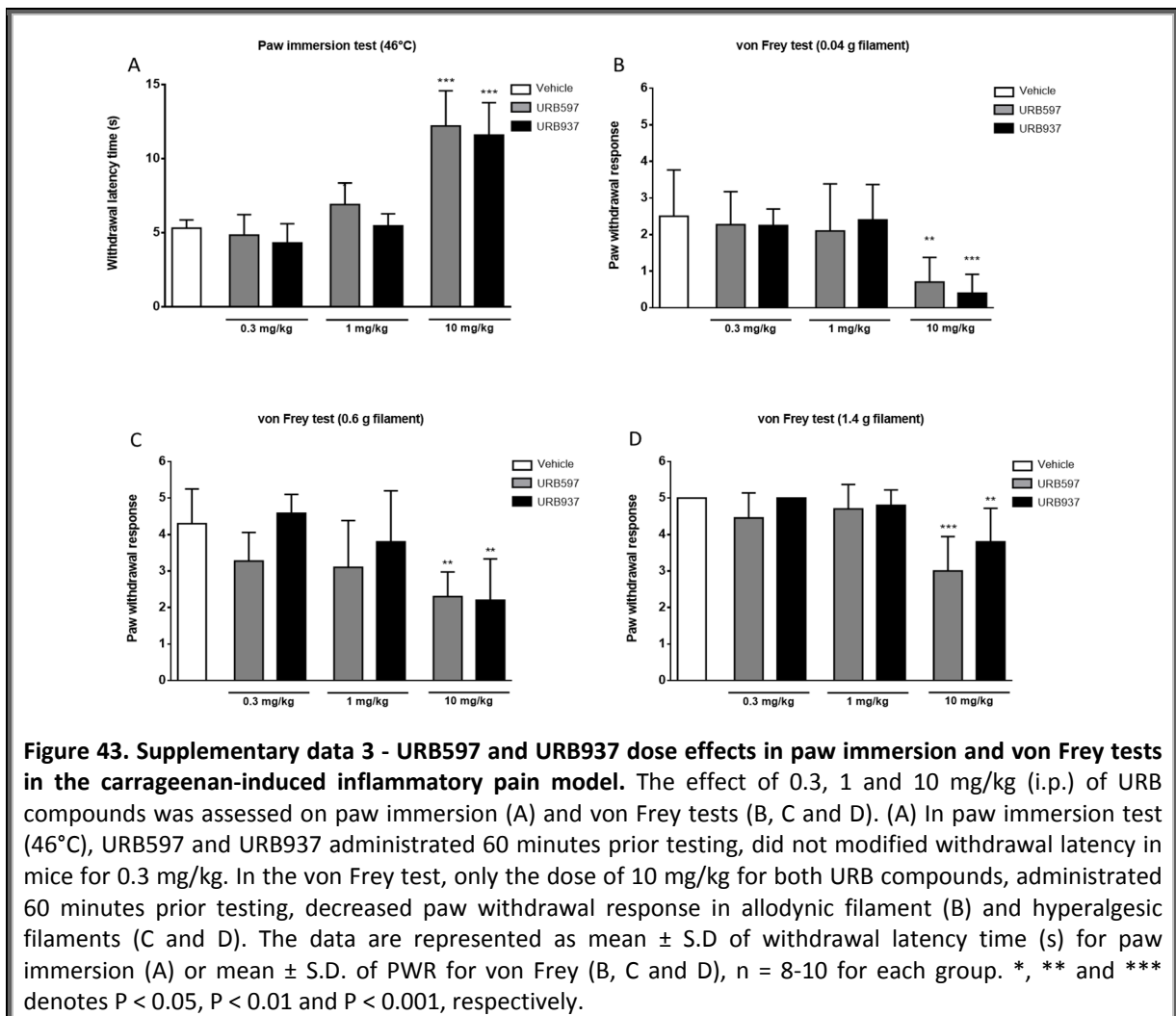
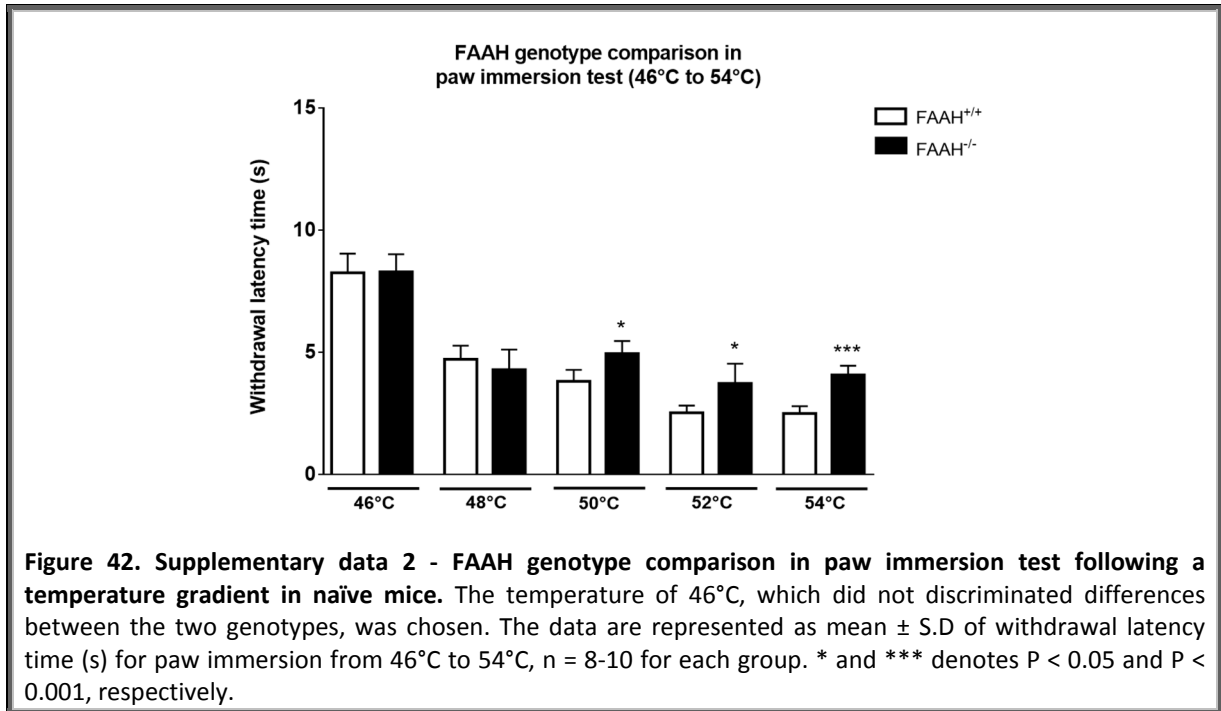
Diet	Rodent pellets (SAFE-A04)
Bedding	Standard Rodent Bedding
Cage rack ventilation	Not ventilated (std. cage)
Home cage enrichment	Others
Habituation time before experiments (in days)	1-7 days
Handling frequency before testing	More than once
Cage cleaning frequency	Once per week
# housed per cage	6+
House experimental/ control groups together or separately	Same cage
Different species housed in same room	No
Lights on time	7:00
Lights off time	19:00
Procedural anesthetic	Inhal. Isoflurane
Post-operative analgesia	No
-Analgesic and dose	

b. Testing

# of testers	1
Experience of tester(s)	4-8 years
Lighting intensity (lux)	350-450
Time testing ends	17:00
Test environment noise	Quiet
Recent calibration of testing equipment	Yes
Cleaning of test equip. between subjects	Yes
-with	Commercial cleaner
Habituation time before testing (in minutes)	30-60 minutes
Oestrus stage of females	Unknown
Number of animals present in testing room	20
Distance separated	Not adjacent in testing
In visual contact	No
Arousal state	Not grooming

Comments on this form to: Andrew Rice a.rice@imperial.ac.uk

Figure 41. Supplementary data 1 - Extended Methods Form. Checklist of experimental methodology. This table details and ensures technical methodological quality of this study as recommended by Rice et al. (2008)



II. Discussion

Our study demonstrates that (i) the FAAH enzyme is involved in the effect of paracetamol in a pathological pain context using an animal model of nociceptive/inflammatory pain, and (ii) supra-spinal FAAH is required for its analgesic action.

A genetic strategy was first used to explore the contribution of FAAH in paracetamol action in an inflammatory pain context. A preliminary experiment confirmed that FAAH^{-/-} mice submitted to the paw immersion test exhibited different nociceptive thresholds compared to their littermates for temperatures above 50°C as previously shown (Cravatt et al., 2001, 2004; Lichtman et al., 2004). We thus used a 46°C temperature to explore paracetamol action in FAAH^{-/-} mice which, as in the cited studies, did not discriminate a nociceptive threshold difference between FAAH^{+/+} and FAAH^{-/-} mice. Regarding mechanical *stimuli* evaluated by von Frey filaments, no difference has been observed between the two genotypes as already reported (Chang et al., 2006). In both pain modalities, the anti-allodynic and anti-hyperalgesic actions of paracetamol were abolished in FAAH^{-/-} mice, generalizing the concept that FAAH is the key enzyme for paracetamol analgesic action in either a naive context (Mallet et al., 2010) or a pathophysiological context (current study). However, one study reported that this was not the case in a visceral pain test (Soukupová et al., 2010). Yet, we have to wonder if this screening nonspecific visceral pain model, which unfortunately is sensitive to non-analgesic compounds (Hendershot and Forsaith, 1959), is relevant to study the mechanism of action of analgesic drugs and especially paracetamol. Moreover, paracetamol is not recommended for visceral pain either by the American College of Gastroenterology or by the British Society of Gastroenterology (Spiller et al., 2007; American College of Gastroenterology Task Force on Irritable Bowel Syndrome et al., 2009). Interestingly, the FAAH requirement was studied regarding other effects of paracetamol. For example, the anxiolytic-like effect of paracetamol observed in the mouse elevated plus-maze test was suppressed by a co-administration of URB597 (Zaitone et al., 2012). However, Ayoub et al. (2004) demonstrated that another effect of paracetamol in mice, hypothermia, was not modified in FAAH^{-/-} mice nor in mice pre-treated with URB597. Thus, FAAH involvement in paracetamol actions, marked for its analgesic action, might differ depending on its pharmacological effect.

To discriminate the peripheral and central involvement of FAAH in paracetamol action, we proposed a pharmacological strategy challenging the analgesic action of paracetamol observed in an inflammatory context with either a peripherally-restricted FAAH inhibitor (URB937, Clapper et al., 2010; Moreno-Sanz et al., 2011, 2012), or a global FAAH inhibitor known to cross the blood-brain barrier (URB597, Clapper et al., 2010). To avoid the intrinsic antinociceptive effect of FAAH inhibitors

(Booker et al., 2012; Sasso et al., 2012), we have preliminarily tested different doses of each URB compound in thermal and mechanical nociceptive modalities. The dose of 0.3 mg/kg (i.p.) was chosen because it did not elicit an antinociceptive effect as previously shown (Costa et al., 2010; Moreno-Sanz et al., 2012). Moreover, Clapper et al. (2010) elegantly demonstrated that, after administration of these inhibitors at the same dose, FAAH activity was robustly reduced both in the brain and peripheral organs for URB597 and only in the periphery for URB937. We showed that, contrary to the peripherally-restricted FAAH inhibitor URB937, the global FAAH inhibitor URB597 significantly abrogated the analgesic action of paracetamol assessed by different nociceptive tests.

To confirm these results and to explore the contribution of brain FAAH in paracetamol action, the counter proof of this experiment was performed. We assessed the analgesic effect of paracetamol after the injection of the peripherally-restricted FAAH inhibitor directly into the brain. Under these conditions, the effect of paracetamol was drastically reduced, highlighting the specific contribution of brain FAAH in paracetamol action. These results are in line with the Högestätt et al. (2005) study, which describes a FAAH-dependent metabolism of systemic paracetamol (300 mg/kg, i.p.) administration into AM404 in the brain but not in the periphery (blood and liver). However, these results contrast with the study of Ruggieri et al. (2008), which observed AM404 formation in the periphery (plasma). The difference between the two studies can be explained by the higher dose of paracetamol (400 mg/kg, i.p.) used in the latter study. Whether AM404 was present in blood or not, our study shows that peripheral FAAH would not be involved in the analgesic action of paracetamol because the effect of paracetamol was unchanged after a co-administration of a brain-impermeant inhibitor. AM404 synthesized by the brain-located FAAH could have different actions putatively involved in its analgesic effect such as inhibiting cellular AEA reuptake leading to an increased level of endogenous AEA or activating TRPV1 receptors (Zygmunt et al., 2000). Both mechanisms could contribute to the analgesic action of paracetamol. We previously demonstrated that brain TRPV1 inhibition suppressed the analgesic action of paracetamol (administered *per os*) or AM404 (injected i.c.v.) (Mallet et al., 2010), suggesting that TRPV1 activation could be the main mechanism. Moreover, the involvement of central FAAH in the analgesic effect of paracetamol is also consistent with our previous data showing that paracetamol acts as a central analgesic. For example, inhibition of the descending serotonergic pathway or the blockade of spinal serotonin receptors inhibited paracetamol-induced analgesia in animals (Bonnefont et al., 2005, 2007; Mallet et al., 2008). In healthy volunteers submitted to acute pain *stimuli*, both inhibition of descending pathways and 5-HT₃ receptor antagonists also reduced the effect of paracetamol in conditions of non-inflammatory pain (Pickering et al., 2006, 2008).

In conclusion, the mechanism of action of systemically administered paracetamol is certainly complex and involves several metabolic and neuronal pathways (Mallet and Eschalier, 2010). Using both genetic and pharmacological strategies, the current results demonstrate that (i) the FAAH enzyme is not only required for the anti-nociceptive action of paracetamol in naive animals but also for its analgesic effect in a pathological context of inflammatory pain; and (ii) only brain, but not peripheral, FAAH is involved, which confirms the central action of paracetamol. Based on these discoveries and previous ones (Barrière et al., 2013), new molecules, substrates of FAAH, would be a novel avenue for pharmacological management of pain. This strategy of pharmacological vectorization, would allow, as for paracetamol, targeting supra-spinal TRPV1 receptors to induce pain alleviation. A proof of concept has been recently performed using HMBA (4-hydroxy-3-methoxybenzylamine), a para-aminophenol analog, metabolized by FAAH into arvanil and olvanil (Barrière et al., 2013). HMBA has been shown to induce a FAAH-dependent analgesia involving supra-spinal TRPV1 receptors.

2^{ÈME} ARTICLE

*The periaqueducal gray matter is a key structure
in the analgesic effect of acetaminophen*

Barrière et al., PAIN (soumis)

1. Synthèse du 2^{ème} article

1. Introduction

Les résultats présentés dans le 1^{er} article viennent confirmer une action essentielle de l'enzyme FAAH, au niveau central, dans le mécanisme d'action antalgique du paracétamol, et ceci également en condition pathologique (Dalmann et al., 2014). Ces données s'ajoutent aux autres arguments ci-dessous démontrant une action centrale du paracétamol :

- L'effet antalgique du paracétamol dépend des récepteurs TRPV1 cérébraux (Mallet et al., 2010).
- Plus précisément, ces effets cérébraux *via* les récepteurs TRPV1 dépendent du métabolite AM404 issu du paracétamol (Mallet et al., 2010).
- De plus, le paracétamol **augmente les taux de la sérotonine** au niveau du tronc cérébral, région intervenant entre autres dans la modulation de la douleur *via* les contrôles descendants sérotoninergiques (Tjølsen et al., 1991; Pini et al., 1996; Dogrul et al., 2012a). Des études cliniques ont d'ailleurs conforté le fait que le paracétamol induisait un **renforcement des contrôles descendants sérotoninergique chez les volontaires sains** (Pickering et al., 2006, 2008).

Malgré les preuves d'un mécanisme central, **nous ne connaissons pas encore aujourd'hui les noyaux cérébraux impliqués** dans l'action antalgique du paracétamol. Notre objectif est donc de rechercher **le substrat cérébral** à l'origine du mécanisme d'action antalgique du paracétamol et de caractériser **le mécanisme cellulaire** mis en jeu dans ce noyau.

Des travaux antérieurs d'imagerie par IRMf, consistant à suivre les variations de contraste **BOLD** de différentes régions cérébrales, ont permis d'obtenir des données préliminaires quant aux noyaux cérébraux impliqués dans l'action antalgique du paracétamol. Les résultats obtenus (**Figure 45**) ont montré des diminutions significatives du contraste BOLD dans le cortex somatosensoriel, moteur, insulaire et cingulaire, au niveau de l'amygdale, l'hypothalamus, le thalamus et **la SGPA**. Cette dernière région du tronc cérébral attire particulièrement notre attention, car elle intervient, entre autres, dans les systèmes de modulation de la douleur par les contrôles descendants sérotoninergiques (Heinricher and Ingram, 2008). Plus particulièrement, nous étudierons le rôle de la partie **ventrolatérale** qui intervient dans les processus d'intégration et de modulation de la douleur induite par un stress physique (Linnman et al., 2011; Paxinos, 2014). Il faut aussi noter que la colonne ventrolatérale de la SGPA est interconnectée avec la RVM et les contrôles descendants sérotoninergiques (Linnman et al., 2011; Paxinos, 2014).

2. Résultats

a. La substance grise périaqueducale, un noyau cérébral clé dans le mécanisme d'action antalgique du paracétamol

D'après les résultats précédemment évoqués, nous avons choisi de nous focaliser sur le rôle de la **vl-SGPA** dans le mécanisme d'action antalgique du paracétamol. Nous avons tout d'abord confirmé immunohistologiquement les données d'IRMf *via* une comparaison de l'expression la protéine c-Fos dans les différentes colonnes de la vl-SGPA. En effet, le paracétamol induit une diminution significative du marquage **de la protéine c-Fos (Figure 46c)** chez le rat, traduisant alors une diminution de l'état d'activation de cellules à ce niveau. Ces données suggèrent que la vl-SGPA est à même d'être modulée par le paracétamol. Cela ne permet toutefois pas d'expliquer un renforcement de la vl-SGPA par le paracétamol, même si le marquage de la protéine c-Fos n'est pas spécifique d'une population neuronale.

Il est également important de définir si cette structure exprime les protagonistes clés nécessaires à l'effet du paracétamol, à savoir l'enzyme FAAH et les récepteurs TRPV1 et CB1. Le marquage immunohistochemique, présenté dans la **Figure 47**, confirme que l'enzyme FAAH est à la fois exprimé dans la vl-SGPA et colocalisé avec les récepteurs CB1 (**Figure 47a**) et TRPV1 (**Figure 47b**). La **Figure 47b** indique qu'environ 50% des cellules de la vl-SGPA expriment l'enzyme FAAH et le récepteur TRPV1 et que 62% des cellules expriment le récepteur CB1. Il a été comptabilisé que les cellules exprimant à la fois l'enzyme FAAH et le récepteur TRPV1 représentent 25% de la population cellulaire de la vl-SGPA et les cellules exprimant à la fois le récepteur CB1 et l'enzyme FAAH représentent, quant à elles, 41,5% de la population cellulaire.

Néanmoins, au niveau de la vl-SGPA, aucune donnée ne justifie que ces protagonistes soient fonctionnellement impliqués dans l'effet antalgique du paracétamol, même s'ils sont exprimés par la structure. Nous avons donc employé une technique de microinjection intranucléaire afin d'administrer de manière ciblée les inhibiteurs et antagonistes d'intérêt. Ainsi, nous avons montré qu'une inhibition *in situ* de la FAAH par l'URB597 est à même de bloquer l'effet antinociceptif du paracétamol sur les tests d'immersion et de pression de la patte (**Figure 48a**). Le paracétamol a aussi un effet dépendant des récepteurs TRPV1 et CB1 dans la vl-SGPA, puisque l'injection de leurs antagonistes respectifs réduit ou annihile l'action du paracétamol administré par voie systémique (**Figure 48b et c**). Nous avons également évalué le potentiel antinociceptif du paracétamol et de ses métabolites lorsque ceux-ci sont directement injectés dans la vl-SGPA. La **Figure 49** montre que le paracétamol seul ne peut pas induire d'effet antalgique dans la vl-SGPA. Par contre, ses métabolites p-aminophénol et AM404 induisent un effet antinociceptif (**Figure 49a et b**). De plus, l'effet

antinociceptif de l'AM404 dans la vl-SGPA est dépendant des récepteurs TRPV1 et CB1 (**Figure 49c**). L'ensemble de ces données positionne la vl-SGPA comme une structure cérébrale clé dans l'action antalgique du paracétamol.

b. Voies cellulaires initiées dans la substance grise périaqueducale via le paracétamol

Enfin, nous avons souhaité caractériser les voies de signalisation impliquées au niveau de la vl-SGPA dans l'action antinociceptive du paracétamol. Parmi les nombreuses voies de signalisation cellulaire pouvant moduler la SGPA, il en existe une **impliquant à la fois les récepteurs TRPV1 et CB1**. De nombreux articles décrivent que l'activation de cette voie est capable de produire un effet antinociceptif dépendant **des voies descendantes sérotoninergiques** (Drew et al., 2008; Liao et al., 2011; Gregg et al., 2012; Wilson-Poe et al., 2013; Palazzo et al., 2014). Cette cascade de signalisation est dépendante d'un étroit équilibre entre le glutamate et le GABA et un agoniste des récepteurs **TRPV1** induit un effet antinociceptif *via* le schéma suivant :

- L'activation des récepteurs TRPV1 présents sur les terminaisons synaptiques **des fibres glutamatergiques** produit une libération de glutamate.
- Le glutamate ainsi relargué stimule des récepteurs métabotropiques au glutamate de type **mGLUR5** au niveau post-synaptique initiant une cascade **PLC-dépendante** avec l'activation d'une **enzyme DAGL** responsable de la synthèse de l'**endocannabinoïde 2-AG**.
- Ce dernier endocannabinoïde se fixe sur les récepteurs **CB1 post-synaptiques des interneurons GABAergiques**, ayant pour effet de lever le rétrocontrôle négatif sur la SGPA activant ainsi les **contrôles descendants** pour induire un effet antalgique.
- Donc, une augmentation de glutamate conduit à une diminution du GABA et à une désinhibition de la SGPA.

Nous suggérons que l'AM404, issu du paracétamol, serait capable d'activer les récepteurs TRPV1 pour produire **un effet antinociceptif dépendamment de la voie de signalisation mGLUR5-PLC-DAGL**. Afin de démontrer cette hypothèse, nous avons dans un premier temps employé une technique non invasive de spectrométrie par résonance magnétique nucléaire (RMN) afin de suivre les variations des taux de GABA et glutamate après administration de paracétamol. Dans un deuxième temps, nous avons conforté notre hypothèse en inhibant dans la vl-SGPA chacun des protagonistes (TRPV1-mGLUR5-PLC-DAGL) afin d'en connaître les répercussions sur l'effet antalgique du paracétamol au travers d'études comportementales chez l'animal. Les résultats présentés dans la

Figure 50c montrent que l'administration orale de paracétamol rompt l'équilibre entre le glutamate et la GABA dans la vl-SGPA, en faveur d'une augmentation du glutamate (**Figure 50b**) et une diminution du GABA (**Figure 50a**). De plus, l'administration dans la vl-SGPA du MPEP (antagoniste mGLUR5), de l'U73122 (inhibiteur de la PLC) et du THL (inhibiteur de la DAGL) réduit les effets antinociceptifs du paracétamol (**Figure 51**).

Pour résumer, ces résultats mettent en évidence, au sein de la vl-SGPA, un lien entre le paracétamol et les variations des taux en GABA et glutamate dans la vl-SGPA et soulignent une relation entre l'effet antalgique du paracétamol et l'activation d'une voie de signalisation selon la cascade : **mGLUR5-PLC-DAGL-2-AG**. Cela laisserait entendre que l'AM404 issue de la biotransformation *in situ* du paracétamol puisse, par l'action sur les récepteurs TRPV1, initier cette cascade pour renforcer les contrôles descendants.

3. Discussion et conclusion

Les travaux menés dans ce 2^{ème} article nous fournissent 3 informations essentielles : **(1)** le paracétamol **modifie le signal BOLD de diverses régions cérébrales impliquées dans les processus de la douleur**, dont la vl-SGPA ; **(2)** Cette dernière structure joue un rôle clé dans la modulation de la douleur *via* les contrôles descendants mais exprime aussi les protagonistes **FAAH, CB1 et TRPV1** qui sont nécessaires à **l'effet antalgique du paracétamol** ; **(3)** L'effet antalgique du paracétamol dépendrait de **la voie de signalisation TRPV1-mGLUR5-PLC-DAGL-CB1 dans la vl-SGPA** alors capable de **renforcer les contrôles descendants et de produire une analgésie**.

a. Impact du paracétamol sur l'activité de la substance grise périaqueducale : inhibition ou désinhibition ?

Les résultats obtenus en IRMf indiquent que le paracétamol produit une diminution du signal BOLD et une diminution de l'activité neuronale c-Fos au niveau de la SGPA. Or, selon notre hypothèse, le paracétamol activerait la SGPA pour renforcer les contrôles descendants. Toutefois, une diminution du signal BOLD et de la l'activité c-Fos pourrait paraître contradictoire avec notre modèle mécanistique présenté jusqu'à présent. Il faut savoir que la SGPA est composée de nombreux neurones GABAergiques qui sont à l'origine d'un tonus inhibiteur sur ce dernier (Behbehani et al., 1990; Lau and Vaughan, 2014). Il est donc possible que la réduction de l'expression de c-Fos observée soit le reflet d'une diminution de l'activité neuronale GABAergique, traduisant une levée du tonus inhibiteur GABAergique. Cette idée est appuyée par la diminution des taux de GABA observée dans la SGPA. Des effets similaires ont été décrits avec l'utilisation d'opioïdes ou d'endocannabinoïdes capable de produire une analgésie *via* une réduction de l'activation GABAergique (Renno et al., 1992;

Lau and Vaughan, 2014; Wilson-Poe et al., 2014). Il serait néanmoins intéressant de préciser si les cellules, dont l'activité c-Fos diminue après administration de paracétamol, appartiennent plus particulièrement à une population de neurones GABAergiques. L'utilisation de souris GAD67-GFP (Tamamaki et al., 2003) serait un atout pour déterminer un lien entre la diminution de l'activité des neurones GABAergiques et l'effet antalgique du paracétamol au niveau de la vl-SGPA. Nous pourrions également vérifier si une inactivation de la vl-SGPA par l'administration d'un agoniste GABAergique comme le muscimol peut réduire l'efficacité antalgique du paracétamol. Des études avaient en effet montré que, dans le cas de la morphine, son effet antalgique était réduit après administration de muscimol dans la vl-SGPA (Munn et al., 2009). Des travaux plus précis de « *patch-clamp* » sur tranches pourraient également apporter des données essentielles sur la probable diminution de l'activité GABAergique après administration de paracétamol (Cf. **Perspectives.I. Paracétamol : mécanisme cellulaire mis en jeu dans substance grise périaqueducale et renforcement des voies descendantes sérotoninergiques**).

b. Le paracétamol et le système mGLUR5-PLC-DAGL

Au niveau de la vl-SGPA, plusieurs auteurs décrivent une voie de signalisation, mGLUR5-PLC-DAGL, dépendant d'un étroit équilibre entre le neurotransmetteur excitateur glutamate et inhibiteur GABA. Notre intérêt s'est porté sur cette voie car elle implique à la fois le récepteur TRPV1 et le récepteur CB1. Au regard de l'implication de ces récepteurs dans l'effet antalgique du paracétamol et de l'activité d'agoniste TRPV1 de l'AM404, nous avons émis l'hypothèse que cette voie de signalisation cellulaire puisse être la clé du mécanisme d'action antalgique du paracétamol. Nos données expérimentales ont justifié que dans la vl-SGPA chacun des acteurs de cette séquence mécanistique est nécessaire à l'effet antalgique du paracétamol. Toutefois, ces études pharmacologiques ne permettent pas de montrer le caractère séquentiel de cette voie de signalisation dans l'effet antalgique du paracétamol. C'est pourquoi il serait intéressant d'intégrer des données électrophysiologiques pour conforter notre hypothèse mécanistique.

The periaqueducal gray matter is a key structure in the analgesic effect of acetaminophen

David André Barrière^{a,b,d*}, Romain Dalmann^{a,b*}, Michaël Bernier^c, Monique Etienne^{a,b}, Eric Chapuy^{a,b}, Maryse Chalus^{a,b}, Amidou Traoré^e, Guy Bielicki^e, Cécile Keller^e, Kevin Whittingstall^c, Philippe Sarret^d, Christophe Mallet^{a,b}, Alain Eschalier^{a,b,f}.

* Equal contribution

- (a) Clermont Université, Université d'Auvergne, Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur, Clermont-Ferrand, France.
- (b) Inserm, U1107 NeuroDol, Clermont-Ferrand, France.
- (c) Département de Radiologie Diagnostique, Université de Sherbrooke, Québec, Canada.
- (d) Département de Physiologie et Biophysique/Institut de Pharmacologie de Sherbrooke, Université de Sherbrooke, Québec, Canada.
- (e) INRA, Centre Clermont-Ferrand/Theix, plateforme RMSB, Saint Genès Champanelle, France.
- (f) CHU Clermont-Ferrand, Service de Pharmacologie, Clermont-Ferrand, France

II. Introduction

Despite its long history as an over-the-counter painkiller, the mechanism of action of acetaminophen (AcAP) remains controversial (Smith, 2009a; Mallet and Eschalier, 2010). Previous studies have demonstrated that AcAP is a pro-drug that requires a two-step metabolism to exert its analgesic effect in animals. AcAP is first deacetylated within the liver into para-aminophenol (pAP), and then pAP is conjugated with arachidonic acid by supraspinal fatty acid amide hydrolase (FAAH) to produce AM404 (Hogestatt et al., 2005; Dalmann et al., 2014), the active metabolite of AcAP. It has also been demonstrated that central TRPV1 (Barrière et al., 2013) and CB1 (Mallet et al., 2008) receptors and the inhibitory bulbospinal serotonergic system (Mallet et al., 2008) are required for the analgesic action of AcAP. However, the precise central mechanisms remain unknown.

Because AM404 has a short half-life (Zygmunt et al., 2000), we hypothesize that during AcAP challenge, AM404 might be synthesized by FAAH in close proximity to CB1 and TRPV1 receptors in cerebral regions involved in AcAP action. Interestingly, CB1, TRPV1 receptors and FAAH have been localized in multiple brain territories involved in pain processes. Indeed, CB1 receptors have been observed in various brain nuclei in rat, such as the somatosensory, prefrontal, cingulate and motor cortices, as well as the nucleus accumbens, striatum, hippocampus and periaqueductal grey matter

(PAG) (Chin et al., 2008). Brain TRPV1 expression is highly restricted in the TRPV1-LacZ mouse model, with the primary localization observed in the hippocampus, caudal hypothalamus, entorhinal cortex and PAG (Cavanaugh et al.). Finally, FAAH is expressed in neurons within the cortex, hippocampus and PAG in mice (Glaser et al., 2006). Consequently, PAG appeared to be a common structure expressing the CB1/TRPV1/FAAH triad and thus a brain candidate for AcAP action. Organized in several longitudinal columns, PAG forms an intersection between ascending sensory nociceptive pathways and descending inputs from higher cerebral structures to coordinate pain modulation (Linnman et al., 2011). In particular, columns forming the ventrolateral portion of the PAG (VL-PAG) have been reported to support central CB1- and TRPV1-dependent analgesia (Maione et al., 2006; Starowicz et al., 2007; Palazzo et al., 2008, 2010; Kauer and Gibson, 2009).

To investigate the brain mechanisms activated during AcAP challenge, we employed pharmacological magnetic resonance imaging (phMRI) at rest to measure both blood oxygen level-dependent (BOLD) signals and functional connectivity among some of the brain regions involved in AcAP action. From this primary screening, we focused on PAG because BOLD contrast as well as functional connectivity were modified and because of its relationship with the descending serotonergic system (Tjolsen et al., 1991; Mallet et al., 2008). Then, we investigated the expression of FAAH, CB1 and TRPV1 in PAG and their involvement in the analgesic effect of AcAP. Finally, we investigated the role of a more integrated cellular cascade within the PAG, involving mGluR5 receptors, phospholipase C and diacylglycerol lipase.

III. Materials and methods

1. Animals

All experiments were carried out using 8-9-week-old male Sprague-Dawley rats (250-275 g; Charles River, Lyon, France). The animals were housed four *per* cage for one week prior to starting the experiments to allow acclimatization and then kept under standard conditions (21-22°C; 12/12 h light/dark cycle; 55% humidity) with food and water *ad libitum*. The experiments conformed to the guidelines of the Committee for Research and Ethical Issues of IASP (Zimmermann, 1983) and were approved by the regional ethics committee for animal experiments in the Auvergne Region in France (CEMEA Auvergne; CEEA-02).

2. Drugs

AcAP was generously provided by Bristol-Myers-Squibb (France). Capsazepine (TRPV1 antagonist) and MPEP (mGluR5 antagonist) were obtained from Tocris Cookson (UK). URB597 (FAAH inhibitor) was obtained from Interchim (France). AcAP was prepared in a saline solution of 0.9% NaCl with constant stirring. AM251, capsazepine and URB597 were dissolved in DMSO/aCSF/Tween (20/75/5), and MPEP was dissolved in aCSF. AM404 in Tocrisolve™ 100 (Tocris Cookson; UK) was diluted in aCSF. All drug solutions were prepared immediately before use.

3. Animal preparation for fMRI and 1H MRS

First, rats were anaesthetized using isoflurane (3-4%, 30% O₂/70% air) and then each animal was fitted with 1) an oral cannula for AcAP administration (PE50) and 2) an intra-femoral cannula (right hind paw for blood sampling [PE20]). The animals were transferred to a cradle designed to fit inside the probe of the MR system and supplied with a 1-2% isoflurane 30% O₂/70% air mix *via* a fitted mask. Body temperature was maintained at 37°C using a feedback-controlled heating pad fitted into the cradle and monitored with a rectal thermocouple probe (Eurotherm). During all the experiments, heart frequency was recorded using a subcutaneously implanted electrode (IITC) on the chest and respiratory frequency was recorded using a respiratory pillow placed between the chest and the cradle and connected to the recorder (Rapid Biomedical). Windaq software was used for monitoring. Heart and respiratory rates were kept stable (448.00 ± 3.38 bpm and 71.08 ± 1.08 bpm, respectively) for each animal. Arterial blood samples were collected before and after the fMRI scanning protocol for blood gas analysis (i-STAT System, i-STAT EG7+). All animals exhibiting hypoxia (paO₂ < 90 mm Hg), hypercapnia (paCO₂ > 60 mm Hg), bradycardia or bradypnea were excluded from the experiment (Data not shown).

4. fMRI method

a. Functional MRI scanning protocol

fMRI scanning was performed using a 4.7 Tesla spectrometer (Biospec 47/40, Bruker Biospin®, Ettlingen, Germany) equipped with a 20 Gauss/cm B-GA 12 gradient insert. Two actively decoupled radio frequency (RF) coils were used: a 7.2 cm-diameter Bruker quadrature volume coil with a RF-transmitter and a 2 cm-diameter surface coil (Rapid Biomedical®, Rimpar, Germany), which were positioned at the top of the animal head for signal reception. After a localization scan using a standard Bruker FLASH-tripilot protocol, a rapid acquisition with relaxation enhancement (RARE) pulse sequence was used to acquire images in the sagittal plane to accurately localize the anterior commissure (-0.8 mm from the bregma) and to ensure repeatability in slice positioning between rats. Then, a high-resolution T1-weighted anatomical scan was performed in the coronal plane using the

same RARE sequence with the following acquisition parameters: a repetition time of 5,000 ms, an echo time of 11 ms, a RARE factor of 8, an effective echo time of 33 ms, a field of view of 2.56 cm, eight 2 mm-thick slices from bregma +2.2 to bregma -10.8 and an acquisition matrix of 256 × 256. After the anatomical scan, fMRI scans were performed with the same set-up and scanning parameters, except that the parameters were adjusted to a repetition time of 2,500 ms, an echo time of 12 ms, an effective echo time of 48 ms, a single average and a matrix size of 128 × 128, with an acquisition time of 40 s. For each fMRI session, 75 scans (15 pre-drug and 60 post-drug administration) were recorded during a period of 50 min. A RARE sequence was used instead of an echo planar imaging (EPI) sequence for two primary reasons: the BOLD contrast provided by RARE sequences is suitable for the relatively long temporal resolution of the pharmacological effect of a drug, and the absence of susceptibility artifacts near air-tissue interfaces allows the preservation of BOLD sensitivity in subcortical regions.

An fMRI scanning protocol was used to study changes in the brain signal intensity using T2-weighted BOLD contrast pre- and post-oral administration of vehicle (physiological serum/DMSO 20%) or AcAP (300 mg.kg⁻¹ diluted in vehicle), without applying any stimulation to animals. The dose of AcAP was selected from our previous work, which demonstrated that 300 mg.kg⁻¹ of AcAP (p.o.) induced a significant analgesic effect without sedative side effects in rats (Mallet et al., 2008). After 10 min of basal scanning sets, rats were orally administered either vehicle solution or AcAP and then scanned over a period of 40 min, which permitted the maximal analgesic effect of AcAP to be observed.

b. BOLD contrast analysis

Data were analyzed using AFNI software (<http://afni.nimh.nih.gov/afni/>). First, all frames from each animal were concatenated using the 3dTcat function and motion-corrected using the 3dvolreg function. The 3dautomask function was used for skull stripping. We then applied Gaussian smoothing of 0.3 mm FWHM using the 3dmerge function. Finally, mean functional images were generated using the 3dcalc function for registration purposes.

AcAP-activated regions were identified using a classical voxel-by-voxel correlation analysis that evaluated significant differences between pre-administration (Images 1 to 15) and post-administration (Images 16 to 75), generating t-scores mapping that corresponded to an uncorrected p value < 0.01. BOLD signal differences were then evaluated between the pre- and post-administration of AcAP ($n = 6$) and vehicle ($n = 9$) in the eight primary structures comprising the pain matrix in humans (Apkarian et al., 2005) and animals (Borsook and Becerra), which are listed below in alphabetical order: amygdala, cingulate cortex, hypothalamus, insular cortex, motor cortex, PAG,

somatosensory cortex and thalamus. For each structure, a specific region of interest from each animal was manually chosen, and then the mean data were extracted from each region of interest for all animals and compiled using GraphPad Prism 6 software.

Δ BOLD was calculated to determine fluctuations in the BOLD signal in each animal throughout the experiment. Δ BOLD was calculated as follows:

$$\Delta BOLD = (BOLD \text{ value post-drug} / \text{mean BOLD value pre-drug}) \times 100$$

Finally, the time effect of AcAP or vehicle administration was determined by calculating the areas under the curve of the Δ BOLD time-course curves (Δ BOLD AUC) using Graphpad Prism 6 software.

c. Functional connectivity analysis

The functional connectivity between selected brain areas was evaluated based on processed mean signal data extracted from each region of interest from each animal. Because functional connectivity is defined as “*the temporal dependence of neuronal patterns that are anatomically distinct*”, we sought to identify significant correlations in the BOLD signal fluctuation between each region for each animal in the vehicle and AcAP groups. For this analysis, we used a matrix correlation to calculate the Pearson coefficient and the p value associated with each comparison. For a p value < 0.03, the time-correlation between two structures was defined as significant, and the two structures were considered to be functionally connected.

5. In vivo ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMRS)

All NMR spectroscopy experiments were performed at 11.7 T using an Avance III Bruker Biospec 117/16 USR equipped with a 152 mm/90 mm gradient coil (750 mT/m, 100 μ s) along with the software ParaVision 5.1 from Bruker. To obtain the ¹H signal, we used a Bruker phase array coil with a quadrature volumetric coil for excitation and a rat brain surface coil for reception.

The PAG was located using T2-weighted anatomic high-resolution axial images acquired using a rapid acquisition with relaxation enhancement pulse sequence (TurboRARE) with the following parameters: RARE factor of 4, effective echo time of 28 ms, repetition time of 3.5 s and number average of 2. The field of view was 2.02 \times 2.02 cm, with an in-plane resolution of 79 \times 79 μ m. For localized spectroscopy, we used a stimulated echo acquisition mode sequence (STEAM) with eddy current compensation. The variable power and optimized relaxation delays module (VAPOR) was activated to suppress the water signal. The volume of interest, 1 \times 2.05 \times 2.05 mm (6.25 μ L) was centered in the lower portion of the PAG (lateral and ventrolateral regions). ¹H NMR spectra were acquired during a period of 42 min that began 15 min after vehicle or AcAP administration, and then

the water signals were estimated over a period of 18 min. The parameters used for this sequence were as follows: echo time of 3 ms, mixing time of 10 ms, repetition time of 4 s, spectral width of 5,000 Hz and number of repetitions of 1024.

In vivo metabolite glutamate and γ -amino-butyric acid (GABA) concentrations, as well as Glutamate/GABA ratios, were determined using Java-based magnetic resonance user interface software (JMRUI) using the quantitation based on semi-parametric quantum estimation (QUEST) semi-parametric algorithm based on signals from a simulated metabolite basis set. The metabolites glutamate and GABA were simulated using NMRSCOPE software and included in the metabolite basis. The water signal obtained from non-suppressed water spectra was used as an internal reference. For this purpose, we assumed a water content of 80% (Papadopoulos et al., 2004). We assumed the visibility of the water signal to be 100% and the water molarity to be 55.5 mol/L. Corrections were performed to account for T2 and T1 effects. *In vivo* results are expressed in mmol/L and represent the mean \pm SD. The metabolites were quantified using Cramer-Rao lower bounds (CRLB) of 10-35%.

6. Surgical procedures and cerebral infusion

Animals were anesthetized with an i.p. injection of ketamine (40 mg.kg⁻¹) and xylazine (5 mg.kg⁻¹). Then, a 25-gauge, 11 mm-long stainless steel guide cannula was stereotaxically (model 940; David Kopf Instruments) lowered until its tip was 1 mm above the VL-PAG according to coordinates from Paxinos and Watson (1986) (anteroposterior, -7.8 mm from the bregma; lateral 3 mm; dorsoventral -5.5 mm, with an angle of 24°). Next, 2.4 mm stainless steel screws were attached to the skull, and the whole skull was anchored using dental cement (Henry Schein, France). During the week following the surgical procedure, the animals were handled daily, weighed and observed. The animals that presented insufficient weight gain or behavioral impairment, such as stereotypy, were excluded and promptly euthanized. One week before and after the operation, rats were submitted to behavioral tests to assess their mechanical and thermal thresholds (Data not shown). On the day of the experiment, the animals were briefly anesthetized with 4% isoflurane, and then 200 nL of capsazepine (6 nmol per animal), MPEP (50 nmol per animal), URB597 (0.5 nmol per animal), AM404 (5-10 nmol per animal) or vehicle was injected in the VL-PAG using a 33-gauge (Phymep, France) injection cannula with a 1 μ L Hamilton syringe. Particularly, the dose of 0.5 nmol/rat of URB597 was chosen because 1) it has been shown to efficiently inhibit FAAH in the VL-PAG (Maione et al., 2006) and 2) it did not show any effect *per se* in our experimental conditions. Five minutes after infusion, AcAP (300 mg.kg⁻¹) was orally administered and thermal or mechanical thresholds were evaluated. At the end of the experiment, the rats were euthanized and decapitated, and then their brains were

collected and fixed for 1 week in a formalin-Prussian Blue solution (10% formalin, 1% potassium ferricyanide, and 2% acetic acid) that formed a blue reaction product with iron particles. The injection sites were confirmed using consecutive cryosections (25 µm); only well-implanted rats were retained for behavioral analysis.

7. *Nociceptive tests*

The design, analysis and reporting of findings were performed according to the ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) guidelines (Rice et al., 2008b) (**Supplementary figure**). All experiments were performed in a quiet room and evaluated by a single investigator in a blinded manner. The treatments were randomized and blindly administered using the block method to avoid any uncontrolled environmental influences. During the test for the influence of antagonists, the animals were injected in the following patterns: vehicle + vehicle; vehicle + AcAP; antagonist + vehicle; and antagonist + AcAP. The treatments included the administration of an antagonist into the VL-PAG, followed by oral AcAP administration.

a. *Mechanical noxious test*

The rats were submitted to the paw-pressure test using an Ugo Basile analgesimeter (probe tip diameter, 1 mm, Bioseb, France) (Mallet et al., 2008; Barrière et al., 2013). The nociceptive thresholds are expressed in grams (g) and were measured by applying an increasing pressure to the right hind paw of each rat until vocalization (cut-off pressure: 750 g). The treatments were performed after measuring two consecutive stable vocalization threshold values, and the experiments were performed 40 min after oral AcAP administration or 20 min after pAP or AM404 administration into the VL-PAG.

b. *Thermal noxious test*

The rat's hind paw was immersed in a water bath maintained at 46°C (Diochot et al., 2012; Devilliers et al., 2013). The nociceptive thresholds are expressed in seconds (s) and were measured by immersing the right hind paw of each rat until paw withdrawal was observed (cut-off time: 15 s). The treatments were performed after measuring two consecutive stable withdrawal responses. The experiments were performed 40 min after oral AcAP administration or 20 min after pAP or AM404 administration into the VL-PAG.

8. *c-Fos immunolabelling and counting*

The rats (175-200 g, n = 8) were randomly assigned to receive either AcAP (300 mg.kg⁻¹, *p.o.*, n = 4) or vehicle (0.9% NaCl, n = 4). Forty minutes after treatment, the animals were anesthetized

with sodium pentobarbital (50 mg.kg⁻¹, i.p) and transcardially perfused with 100 ml of 0.1 M phosphate buffered saline (pH 7.4), followed by 500 ml of 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M PBS (pH 7.4). The brains were post-fixed for two hours in the same fixative solution and then embedded in paraffin. Then, brain sections (5 µm) from -7.6 mm and -8.0 mm to the bregma were generated. After antigen retrieval, H₂O₂ treatment, and blocking of non-specific sites, the sections were incubated overnight at 4°C with a primary c-Fos antibody (sc-52, Santa Cruz Biotechnology, Germany). We then processed the sections using a Dako streptavidin-biotin-peroxidase kit according to the manufacturer's instructions (Dako, France). Antibody binding was visualized using 3,3'-diaminobenzidine. Negative controls were generated by omitting the primary antibody during the procedure. To provide valid quantification results, all images of each brain were captured under identical exposure times using a Zeiss Axio Scope.A1 microscope equipped with a Zeiss Axiocam Mrc5 camera. Positive cells were manually counted by a blinded experimenter using Axiovision 4.8 software from a set of slides containing both groups and the previously randomized negative control.

9. TRPV1, CB1 and FAAH co-localization

Naive rats (n = 4, 175-200 g) were transcardially perfused with 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS, pH 7.4. Each brain was embedded in paraffin, and consecutive brain sections (5 µm) between -7.6 mm and -8.0 mm to the bregma were generated. After antigen retrieval and blocking of non-specific sites, the sections were incubated overnight at 4°C with either the anti-CB1 (1:100; Goat, anti-CB1 (K-15): SC10068, Santa Cruz) or anti-TRPV1 antibody (1:100; goat anti-TRPV1 (P-189), SC-12498, Santa Cruz) combined with an anti-FAAH antibody (1:100; mouse anti-FAAH, WH0002166M7, Sigma-Aldrich). Then, the sections were incubated with a mixture of FITC- and rhodamine-conjugated secondary antibodies (1:1,000, FluoProbes, Interchim) for two hours at room temperature. Non-specific staining was determined by excluding the primary antibody, and autofluorescence was chemically bleached using cupric sulfate (10 mM) in ammonium acetate buffer (50 mM; pH 5.0 final). Cupric sulfate solution has been shown to be useful against autofluorescence in neural tissue (Schnell et al., 1999). Finally, the sections were incubated in DAPI solution (1:40,000; Millipore) to stain nuclei. Immunophotography and counting was performed using a Zeiss Axio Scope.A1 microscope equipped with a Zeiss Axiocam Mrc5 camera. Image merging was performed using Axiovision 4.8 software. Quantification of CB1-, TRPV1- and FAAH-positive cells was performed in the VL-PAG and normalized to DAPI staining [(Number of positive cells*100)/Number of total cells].

10. Statistical analysis

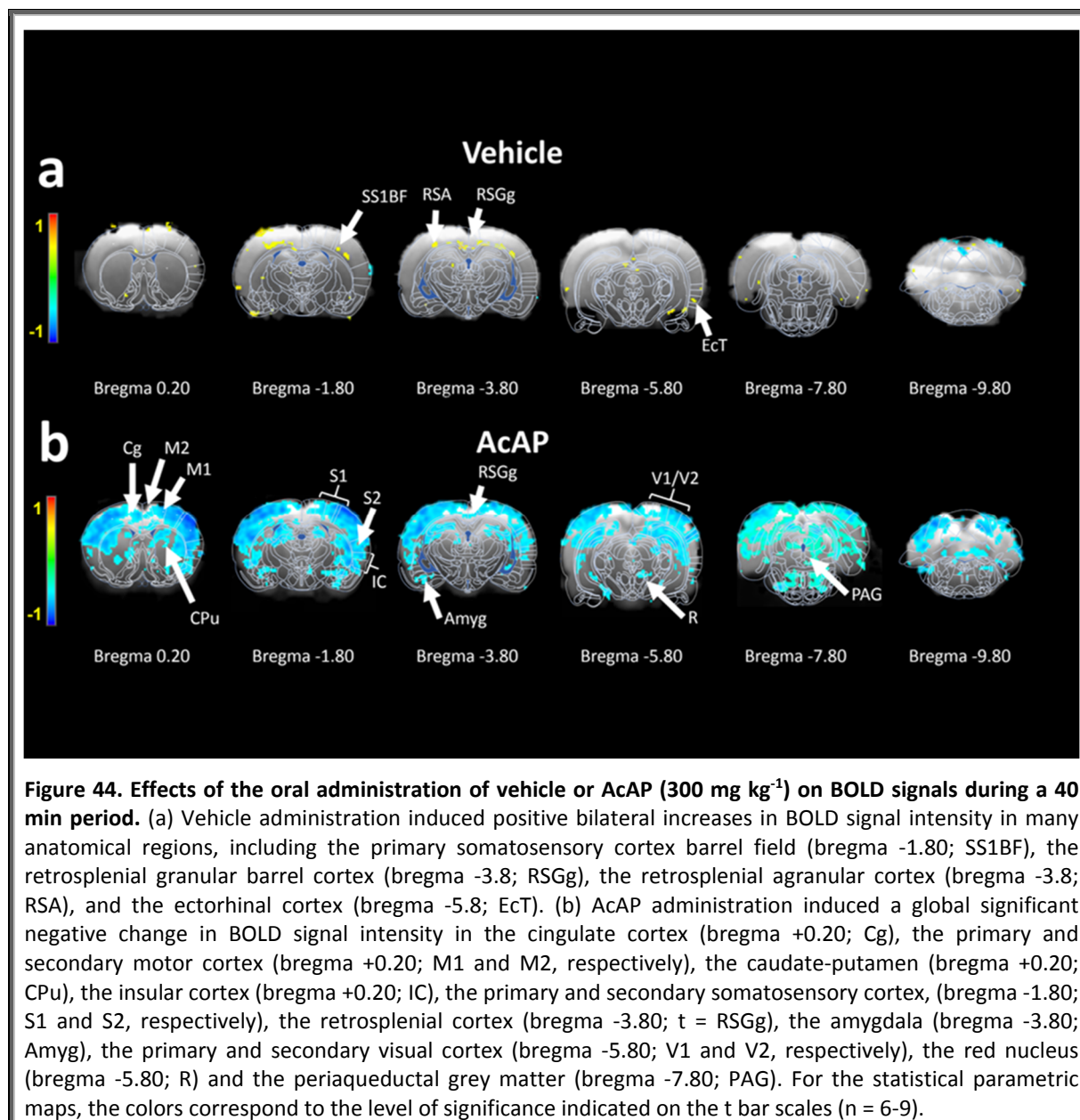
All data were collected, compiled and analyzed using GraphPad Prism 6.02 software. The data are presented as means ± standard error of the mean (S.E.M.). Differences in the AUC ΔBOLD signal

and glutamate/GABA quantification between the vehicle and AcAP groups (**Figs. 2 and 7**, respectively) were evaluated using an exact two-tailed Mann-Whitney t-test. Correlation analysis between regions of the pain-related structures was performed by computing the correlation between each pair of structures (correlation matrix), assuming a Gaussian distribution to evaluate the Pearson coefficient (D'Agostino & Pearson omnibus normality test). To statistically control for the inherent error associated with multiple regressions in our correlation matrix, we calculated that the p value necessary to remove significant correlations due by chance is 0.03. Therefore, for this analysis, the significance threshold is $p < 0.03$ (**Fig. 3a**). A two-tailed test was performed to evaluate the associated p values (**Figs. 3a, b**). Data from the c-Fos numeration (**Fig. 3c**) did not assume a Gaussian distribution (d'Agostino & Pearson omnibus normality test) and were consequently analyzed using a Kruskal-Wallis test (one-way ANOVA on rank), followed by Dunn's multiple comparison test. Data from GABA and glutamate quantification (**Figs. 7a, b, c**) did not assume a Gaussian distribution (d'Agostino & Pearson omnibus normality test) and were consequently analyzed using a Mann-Whitney comparison test (U-test). One-way ANOVA was used to evaluate differences in the behavioral experiments, followed by the Holm-Sidak post hoc test (**Figs. 5, 6 and 8**). Additionally, a two-way repeated-measures ANOVA, followed by the Bonferroni post hoc test, was performed to determine the AM404 dose effect (**Fig. 6b**). The level of statistical significance was set at $p < 0.05$ (*).

IV. Results

1. Decrease in blood-oxygen-level dependent (BOLD) contrast and functional connectivity in the pain matrix during the AcAP challenge

Using BOLD, differences between the pre- and post-oral administration of vehicle or AcAP can be observed (**Figure 44a and b**, respectively). A fixed-effect analysis revealed significant positive bilateral increases in the intensity of the BOLD signal following vehicle administration in several anatomical regions, including deep layers of the primary somatosensory cortex, retrosplenial granular barrel cortex, retrosplenial agranular cortex and ectorhinal cortex (**Figure 44a**). These activations, observed following oral vehicle administration, are consistent with those observed in response to a gastric distension challenge (Min et al., 2011). Following oral AcAP administration, a significant negative change in BOLD signal intensity was observed in the cingulate cortex, primary and secondary motor cortex, caudate-putamen, primary and secondary somatosensory cortices, insular cortex, retrosplenial cortex, amygdala, primary and secondary visual cortices, red nucleus and PAG (**Figure 44b**).



Due to our interest in the analgesic effect of AcAP, we focused our analysis on the somatosensory, motor, insular and cingulate cortices and the amygdala, hypothalamus, thalamus and PAG, which are the major structures associated with the pain pathway in humans (Apkarian et al., 2005) and rats (Borsook and Becerra) (often called the “pain matrix”). To refine our analysis, we evaluated differences between the areas under the curves (vehicle *versus* AcAP) of the mean time-course of the Δ BOLD signal extracted from each region of interest within pain-related structures to evaluate the modifications observed in BOLD contrast during the AcAP challenge (**Figure 45**). We found that the administration of AcAP significantly diminished the Δ BOLD signal in the insular ($P = 0.0120$; **Figure 45a**) and somatosensory cortices ($P = 0.0076$; **Figure 45b**), as well as in the amygdala ($P = 0.0028$; **Figure 45c**), hypothalamus ($P = 0.0048$; **Figure 45d**) and PAG ($P = 0.0007$; **Figure 45e**).

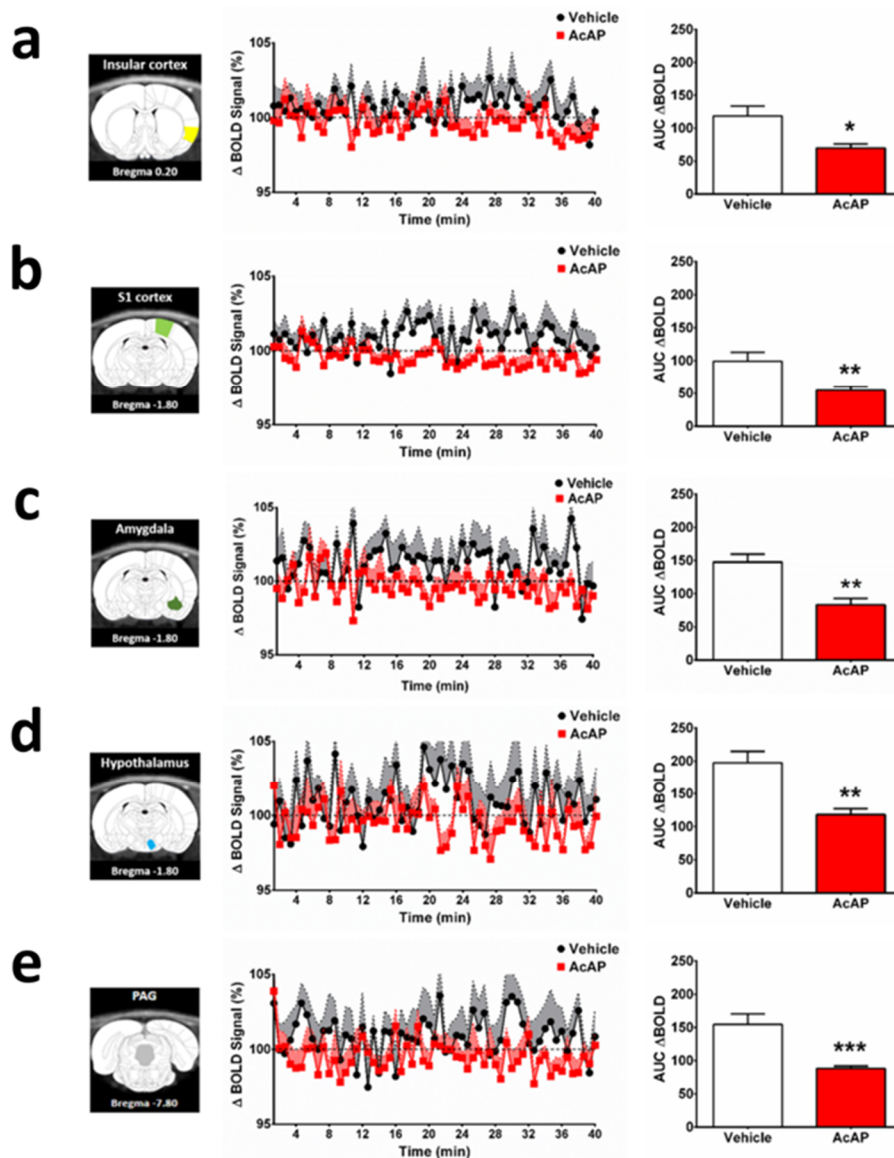


Figure 45. Evolution of the BOLD signal from the initial baseline (Δ BOLD) in cortical structures of the pain matrix between vehicle- and AcAP-treated (300 mg kg^{-1}) groups. To determine the effects of AcAP throughout the recording session, we calculated the area under the curve of Δ BOLD (AUC Δ BOLD) for each region of interest and then we demonstrated that the BOLD signal was significantly different between the vehicle and AcAP groups in the (a) insula, (b) somatosensory cortex, (c) amygdala, (d) hypothalamus and (e) periaqueductal grey matter (PAG). The red and grey traces on the graph show the variance for each group (S.E.M.). Differences in the AUC of the Δ BOLD signal between the vehicle and AcAP groups were estimated using an exact, two-tailed, Mann-Whitney t-test. Error bars represent the SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with the vehicle-treated group ($n = 6-9$).

We also attempted to explore the brain's functional connectivity at rest after administration of vehicle or AcAP. Indeed, using time series acquisition of BOLD signal fluctuations, we could evaluate the specific effect of AcAP in brain territories known to be involved in pain modulation (somatosensory, motor, insular and cingulate cortices, and the amygdala, hypothalamus, thalamus and PAG). Using time-series correlation analysis, we demonstrate here that a sustained functional connectivity was observed after oral administration of vehicle since, 23 significant correlations (blue

values) were found associated with the pain matrix (**Figure 46a, top table**). However, after oral administration of AcAP, the same time-series correlations were substantially decreased because only 8 functional connections were maintained in the AcAP-treated group (red values). Moreover, an additional functional connection (green value) between the PAG and the insular cortex was observed in the AcAP group but not the vehicle group (**Figure 46a, bottom table**). Considering the importance of the PAG in nociception, we focused on the AcAP-induced effects on its connectivity. With respect to the PAG, the AcAP challenge promoted functional connectivity with the insula ($R = 0.2885$; $P = 0.012$; **Figure 46b, left panel**), conserved functional connectivity with the hypothalamus ($R = 0.2527$; $P = 0.029$; **Figure 46b, central panel**) and inhibited functional connectivity with the amygdala ($R = 0.1115$; $P = 0.8253$; **Figure 46b, right panel**). Finally, PAG involvement in AcAP-induced analgesia was also confirmed by measuring neuronal activity using c-Fos immunolabeling. We observed that oral AcAP administration in awake rats significantly decreased c-Fos labeling throughout the PAG ($F_{1, 28} = 29.85$; $P < 0.0001$; **Figure 46c**). Together, these results demonstrate that the PAG may be an important structure in AcAP-induced analgesia, justifying further investigation into its role in this process.

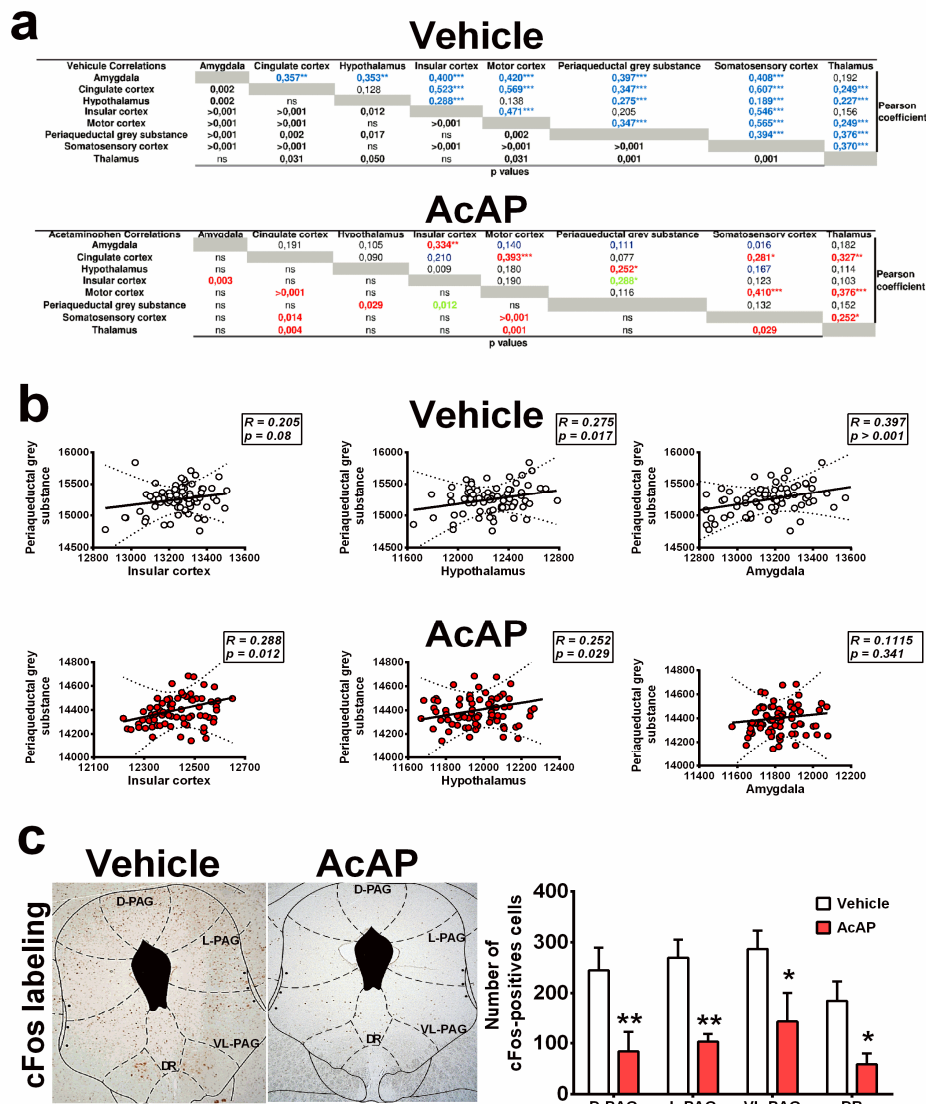
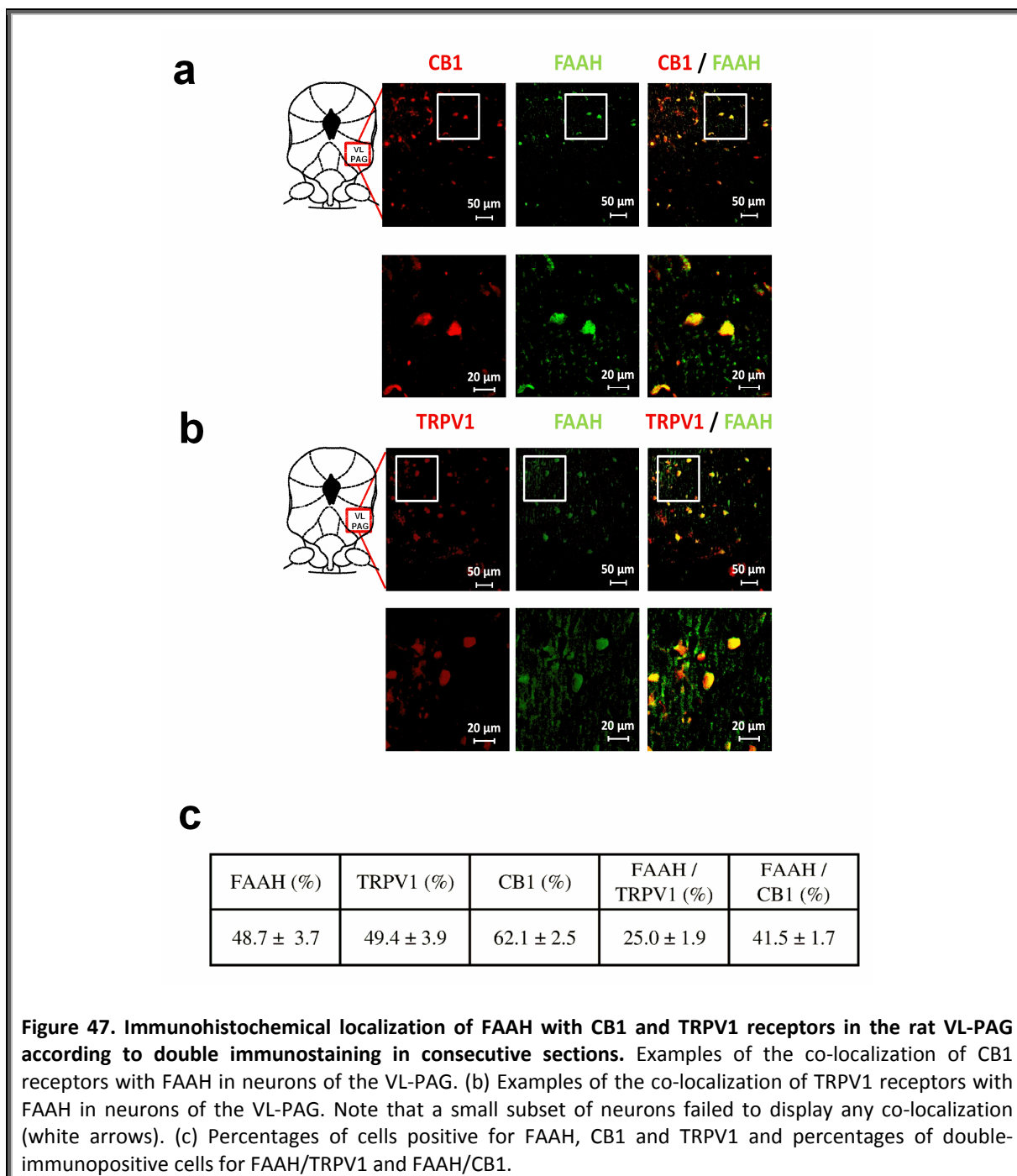


Figure 46. The functional connectivity in pain-related structures during the AcAP challenge highlights the involvement of the PAG in the central effect of AcAP. (a) A seed-based analysis method was used to evaluate functional connectivity in the vehicle and AcAP-treated groups (300 mg.kg⁻¹). The tables present matrices of the mean correlations, where the mean BOLD signal time course corresponding to a brain structure has been extracted from each animal and compared with the BOLD signal time course of all other cerebral structures. Two structures were considered functionally connected with a significant p value ($p < 0.03$). In the vehicle table, the blue values represent the significant functional connection and indicate a high degree of connectivity in pain-related structures (“pain matrix”). The functional connectivity was drastically diminished in the AcAP-treated group; however, eight connections, shown as red values, remained strong: the insula/amygdala, motor cortex/cingulate cortex, PAG/hypothalamus, somatosensory cortex/cingulate cortex, somatosensory cortex/motor cortex, thalamus/cingulate cortex, thalamus/motor cortex and thalamus/sensorimotor cortex. In this table, the green value represents a novel connection, insula/PAG, which was induced by the AcAP challenge. (b) The graph represents the AcAP-induced functional connectivity reordering in the PAG. The effect of vehicle (white circles) versus AcAP (red circles) on the functional connectivity between the PAG and insula (left) and between the hypothalamus (center) and amygdala (right) demonstrates that the AcAP challenge promoted functional connectivity with the insula, inhibited functional connectivity within the amygdala and conserved functional connectivity in the hypothalamus. (c) The immunohistochemical labeling and quantification of c-Fos revealed a strong decrease in c-Fos-positive cells in throughout the PAG at 40 min after oral AcAP administration compared with that of vehicle-treated rats. Correlation analyses between each pair were calculated using Pearson coefficients, and p values were estimated using a two-tailed Student’s t-test for each comparison; * $p < 0.03$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. The c-Fos data were compared using the Kruskal-Wallis test (one-way ANOVA on rank), followed by Dunn’s multiple comparison test because a Gaussian distribution is not assumed here. Error bars represent the SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the vehicle-treated group ($n = 4$).

2. FAAH and the CB1 and TRPV1 receptors in the PAG are involved in AcAP-induced analgesia

We first demonstrated that approximately 49% of VL-PAG cells expressed FAAH or TRPV1 and approximately 62% expressed CB1 (Figure 47c). Forty-one percent of FAAH-positive cells also expressed CB1 (Figure 47a), and 41% expressed TRPV1 (Figure 47b) receptors. Thus, production of AM404 by FAAH may occur near its targets in the VL-PAG.



Subsequently, we confirmed that these three VL-PAG proteins are involved in the analgesic effect of systemically administered AcAP. First, microinjection of the FAAH inhibitor URB597 into the VL-PAG suppressed AcAP-induced analgesia during mechanical ($F(3, 23) = 21.11$; $p < 0.0001$; **Figure 48a, left panel**) and thermal ($F(3, 27) = 13.26$; $p < 0.0001$; **Figure 48a, right panel**) nociceptive tests. Moreover, microinjections of the CB1 inverse agonist AM251 and the TRPV1 antagonist capsazepine into the VL-PAG also inhibited oral AcAP-induced analgesia during both mechanical (AM251: $F(3,18) = 12.14$, $p = 0.0001$; capsazepine: $F(3, 27) = 41.10$, $p < 0.0001$; **Figure 48b and c, left panels**) and thermal noxious *stimuli* (AM251: $F(3, 20) = 29.69$, $p < 0.0001$; capsazepine: $F(3, 19) = 14.15$, $p < 0.0001$ **Figure 48b and c, right panels**)

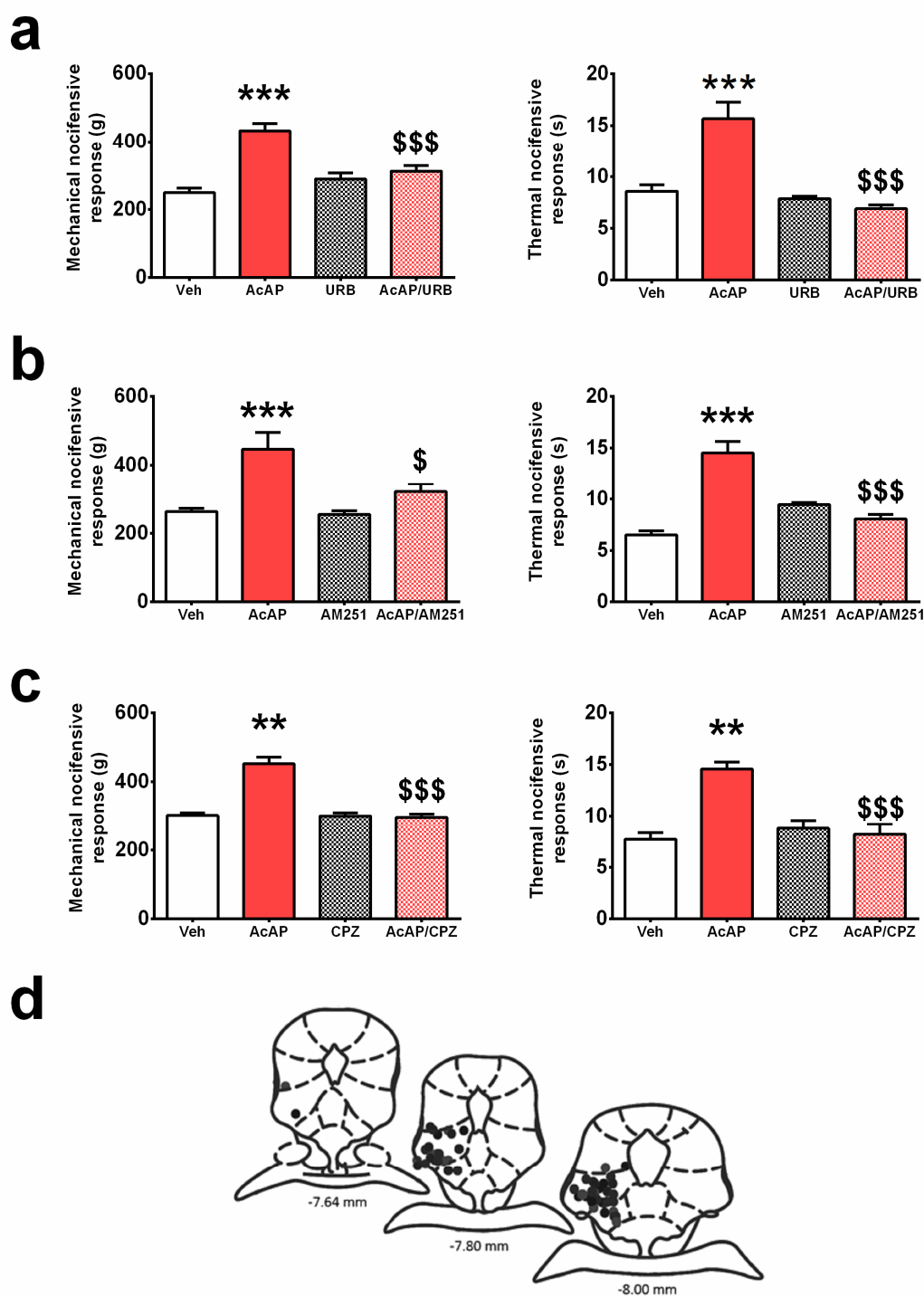


Figure 48. FAAH, CB1 and TRPV1 receptors in the VL-PAG are responsible for AcAP-induced mechanical and thermal analgesia. Analgesic effect of AcAP (300 mg kg⁻¹; red bars) [increase in reaction threshold (g) or time (s)] assessed using mechanical (left panel) and thermal (right panel) noxious *stimuli* were abolished by intra-VL-PAG injection of (a) the FAAH inhibitor URB597 (0.5 nmol); (b) the CB1 inverse agonist AM251 (2.5 nmol); and (c) the TRPV1 antagonist capsazepine (6 nmol) (cross-hatched red bars). (d) Schematic representation of VL-PAG microinjection site. These experiments were performed 40 min after AcAP administration. Data were compared using one-way ANOVA followed by Holm-Sidak's multiple comparisons test. Error bars represent the SEM. **p < 0.01, ***p < 0.001 compared with the vehicle-treated group. \$p < 0.05 and \$\$\$p < 0.001 compared with the AcAP-treated group (n = 5-8, depending on the group).

To confirm that this analgesic effect of AcAP on the VL-PAG was due to its metabolites, specifically AM404, we present the following observations: i) the absence of an analgesic effect after direct AcAP administration in the VL-PAG in rats submitted to either mechanical (**Figure 49a, left panel, red bar**) or thermal nociceptive tests (**Figure 52a, right panel, red bar**); ii) an analgesic effect of VL-PAG-injected pAP in the same two behavioral tests ($F_{(4, 39)} = 10.13, p < 0.0001$, **Figure 49a, right panel**, for the thermal test; $F_{(4, 39)} = 15.78, p < 0.0001$, **Figure 49a, left panel**, for the mechanical test, **blue bars**) and its inhibition following the co-administration of URB597 into the VL-PAG ($F_{(3, 32)} = 7.232; p < 0.0008$; data not shown); and iii) an analgesic effect of VL-PAG-injected AM404 in the two same tests ($F_{(3, 12)} = 3.676, p = 0.0436$, **Figure 49b, right panel**, for the thermal test; $F_{(3, 22)} = 3.876; p = 0.0230$, **Figure 49b, left panel**, for the mechanical test). This analgesic effect of AM404 was inhibited by the co-injection of a CB1 inverse agonist ($F_{(3, 16)} = 14.85; p < 0.0001$; **Figure 49c, right panel**) and a TRPV1 receptor antagonist ($F_{(3, 16)} = 6.912; p = 0.0034$; **Figure 49c, left panel**).

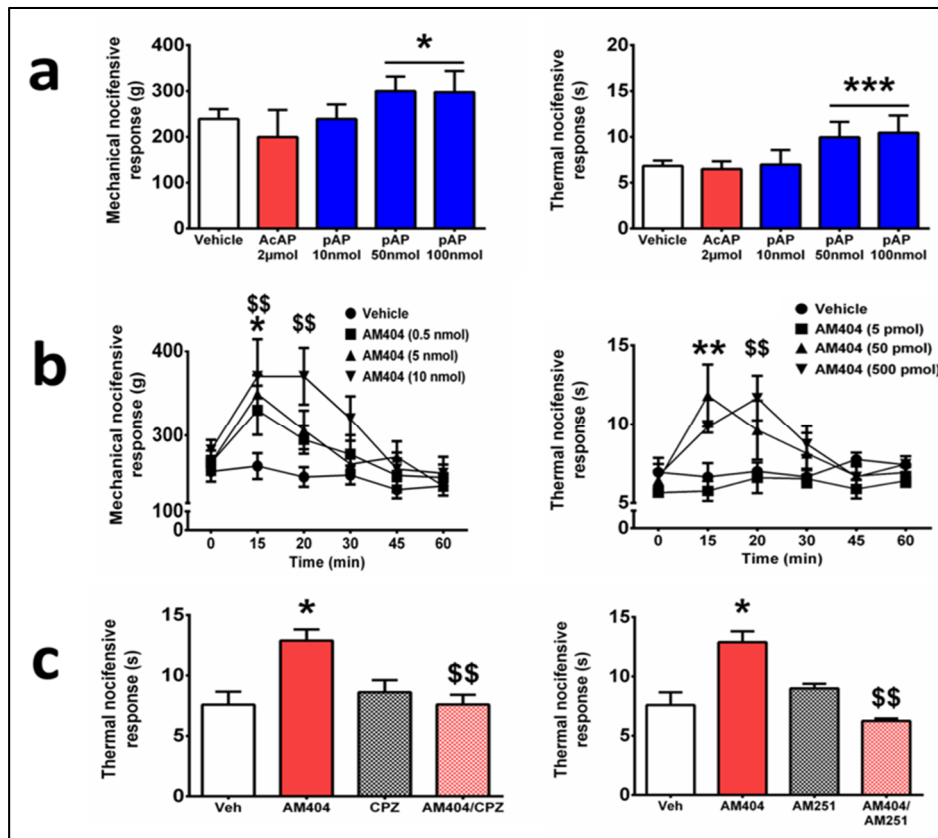
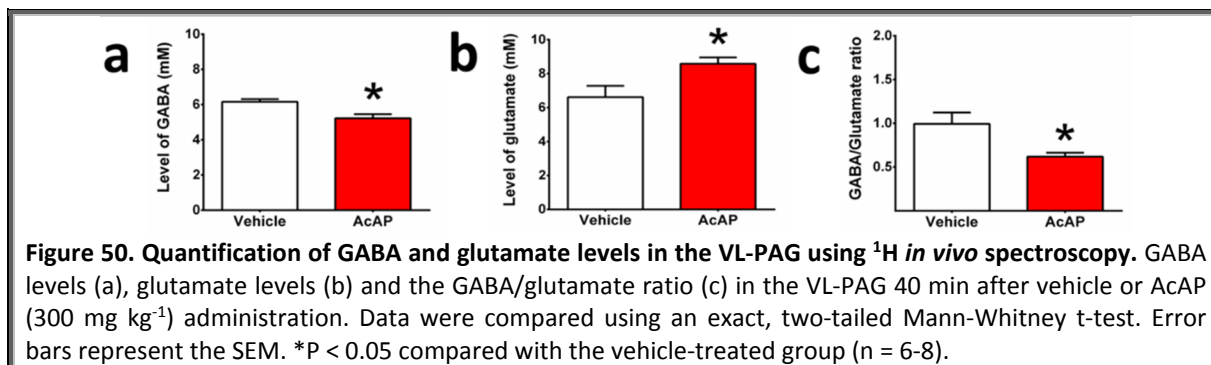


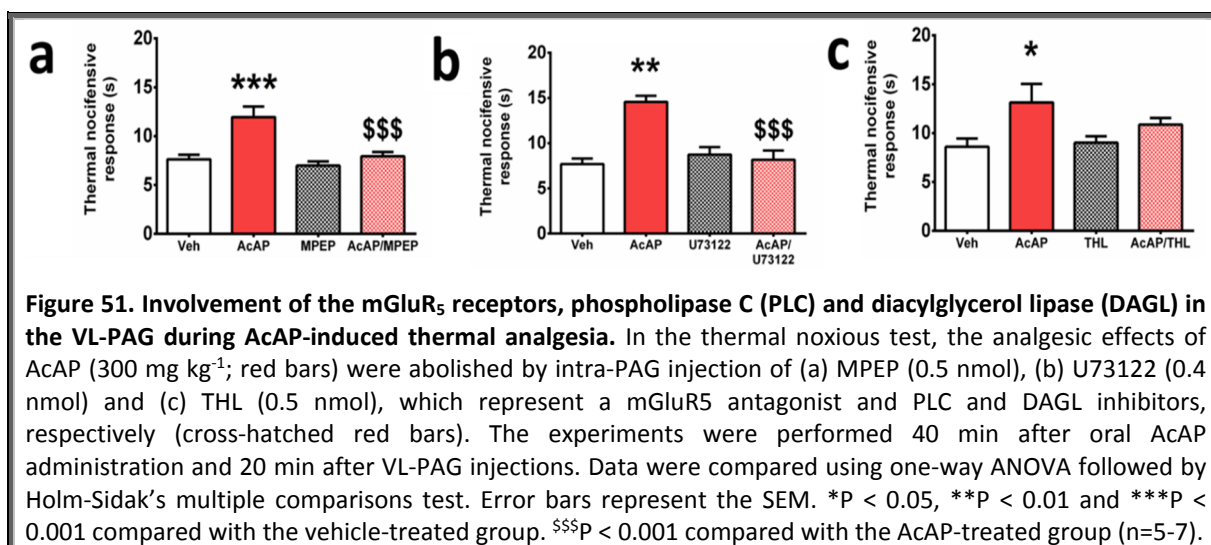
Figure 49. Injection of the AcAP-metabolites pAP and AM404 into the VL-PAG induces analgesia. (a) Although a saturating concentration of AcAP did not modify scores, VL-PAG injection of pAP induced analgesia during both mechanical (left panel) and thermal (right panel) noxious tests. (b) VL-PAG injection of AM404 induced a short analgesic effect on thermal (left panel) and mechanical (right panel) nociceptive tests. (c) The analgesic effect of AM404 (10 nmol) administered into the VL-PAG was abolished by the co-administration of capsazepine (CPZ; 6 nmol; left panel) or AM251 (2.5 nmol; right panel), indicating that AM404-induced analgesia in the VL-PAG was CB1- and TRPV1-dependent. This experiment was performed 20 min after intra-VL-PAG administration. Data for (a) and (c) were compared using one-way ANOVA followed by Holm-Sidak's multiple comparisons test. Error bars represent the SEM. * $p < 0.05$ compared with the vehicle-treated group. The data for (b) were compared using two-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparisons test. Error bars represent the SEM. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ when the results of 50 pmol and 5 nmol were compared with those of the vehicle-treated group. \$\$ $p < 0.01$ when the results of 10 nmol and 500 pmol were compared with those of the vehicle-treated group (b). \$\$ $p < 0.01$ compared with the AcAP-treated group (c) ($n = 5-8$).

3. Oral AcAP enhances VL-PAG glutamate neurotransmission, which underlies an analgesic effect involving the mGluR5/phospholipase C (PLC)/diacylglycerol lipase (DAGL) pathway

Using ¹H *in vivo* spectroscopy, we demonstrated that AcAP induced a significant decrease in GABA levels ($P = 0.0315$; **Figure 50a**) concomitantly with a significant increase in glutamate levels ($P = 0.0495$; **Figure 50b**), which modified the GABA/glutamate ratio in the VL-PAG of anesthetized rats ($P = 0.0122$; **Figure 50c**).



We next demonstrated that glutamatergic neurotransmission within the VL-PAG was involved in the analgesic effect of AcAP. Indeed, administration of the mGluR5 selective antagonist MPEP into the VL-PAG suppressed AcAP-induced analgesia ($F(3, 38) = 10.77$; $p < 0.0001$; **Figure 51a**). Because activation of mGluR5 receptors in the VL-PAG was able to sustain 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) production via diacylglycerol lipase (DAGL) through a PLC-dependent pathway (Liao et al., 2011), we injected the following inhibitors into the VL-PAG: i) U73122, which selectively inhibits the coupling of mGluR5 with PLC activation, and ii) THL, which is a specific inhibitor of DAGL. Both compounds significantly decreased the analgesic effect of AcAP ($F(3, 19) = 14.15$, $p < 0.0001$, **Figure 51b**; $F(3, 24) = 3.568$, $p = 0.0289$, **Figure 51c**).



4. Supplementary Data

Extended Methods Form

Rice ASC, Cimino-Brown D, Eisenach JC, Kontinen VK, LaCroix-Fralish ML, Machin I, Mogil JS, Stöhr T. Animal models and the prediction of efficacy in clinical trials of analgesic drugs: a critical appraisal and call for uniform reporting standards. *Pain* 2008;139(2):241-5

1. Experimental design		2. Animals	
Experiments blinded	Yes	Age	Young Adult
- what	Drug Condition	Sex	Male
- how	Observers unaware of treatment	Genetic background of mutation	Mice strain: C57BL/6
Randomization	Yes	Supplier	Charles River, Italy
Power calculation	Yes	Weight Range	20-30 g
How many data points removed?	1-5	Behavioral Abnormalities	None
- why	If the value exceeds $\pm 2SD$	Any additional comments	KO mice were initially generated by B. Cravatt
3. Environment			
a. Housing		b. Testing	
Diet	Rodent pellets (SAFE-A04)	# of testers	1
Bedding	Standard Rodent Bedding	Experience of tester(s)	4-8 years
Cage rack ventilation	Not ventilated (std. cage)	Lighting intensity (lux)	350-450
Home cage enrichment	Others	Time testing ends	17:00
Habituation time before experiments (in days)	1-7 days	Test environment noise	Quiet
Handling frequency before testing	More than once	Recent calibration of testing equipment	Yes
Cage cleaning frequency	Once per week	Cleaning of test equip. between subjects	Yes
# housed per cage	6+	-with	Commercial cleaner
House experimental/control groups together or separately	Same cage	Habituation time before testing (in minutes)	30-60 minutes
Different species housed in same room	No	Oestrus stage of females	Unknown
Lights on time	7:00	Number of animals present in testing room	20
Lights off time	19:00	Distance separated	Not adjacent in testing
Procedural anesthetic	Inhal. Isoflurane	In visual contact	No
Post-operative analgesia	No	Arousal state	Not grooming
-Analgesic and dose			

Comments on this form to: Andrew Rice a.rice@imperial.ac.uk

Figure 52. Extended methods form. Checklist of experimental methodology. This table details and ensures technical and methodological quality of this study as recommended by Rice et al. (2008).

V. Discussion

Through this study, we arrived at the following conclusions: i) AcAP modifies the activity of several pain-related structures; ii) AcAP induces changes in the levels of amino acids in the PAG; and iii) the analgesic effect of AcAP depends on the recruitment of a PAG-located TRPV1-mGluR5-PLC-DAGL-CB1 signaling cascade.

1. Brain functioning and connectivity during the AcAP challenge

Our imaging study revealed that oral administration of AcAP induced notable decreases in the amplitudes of BOLD signals and the functional connectivity within the insula, somatosensory cortex, amygdala, hypothalamus and PAG. These results are consistent with those of a recent study performed in healthy volunteers (Dewall et al., 2010). In that study, the authors demonstrated that chronic oral administration of AcAP reduced the amplitude of BOLD signals in numerous structures during a “social pain” paradigm. The present results are also consistent with those obtained by Becerra *et al.* (2006), who showed an inhibitory effect of morphine in healthy volunteers on BOLD activity of the same five structures related to pain modulation (Becerra et al., 2006). This suggests that such an inhibition could account for an analgesic effect.

Regarding connectivity, two main results were obtained after AcAP challenge: an important loss of the functional connectivity and a *de novo* functional connectivity between the insula and PAG. Modifications of functional connectivity in a neuronal network remain under debate. Nevertheless, we observed that, both in our work and in studies in humans (Becerra et al., 2006) and animals (Nasrallah et al., 2012), analgesic challenges induced a loss of synchrony between pain-related structures, which suggests a potential link between decrease in connectivity and analgesic effects. Moreover, AcAP induced a *de novo* functional connectivity between the insular cortex and PAG, two structures known to be anatomically (Nieuwenhuys et al., 2007) and functionally connected (Chen et al., 2010). As a cortico-limbic structure, the insular cortex receives nociceptive inputs through the afferent pain network (somatosensory cortex), interacts with the limbic system (amygdala) and modifies the pain threshold through direct interactions with the pain modulatory system (hypothalamus, PAG) (Millan, 2002). Therefore, the insula is connected with all other structures involved in AcAP-induced analgesia and is well placed to modulate pain thresholds in response to a noxious stimulation. Interestingly, a microinjection of morphine within the rostral agranular insular cortex (RAIC) has been shown to produce analgesia (Burkey et al., 1996). RAIC sends dense glutamatergic projections onto the VL-PAG and has been shown to recruit the PAG/RVM network to induce analgesia through the descending inhibitory pathways (Chen et al., 2010). This functional link between the two structures has also been shown in a clinical study that demonstrated that an

enhanced functional connectivity between the insula and PAG was correlated with a decrease in pain perception (Ploner et al., 2010). Those authors also suggested that this pain-inhibiting influence of the insula on the PAG modulated inhibitory descending pathways to reduce pain. Even if further investigations are needed, the present work shows the same enhanced functional link between the insula and the PAG during AcAP challenge in rats, supporting the idea that AcAP would promote the activation of the inhibitory descending system through a cortico-mesencephalic pathway.

2. The levels of amino acids in the PAG are modified during AcAP challenge

The involvement of the PAG during the AcAP challenge was confirmed by our ¹H spectroscopy study on amino acid levels in the PAG. Oral AcAP administration reduced GABA levels while glutamate levels increased concomitantly, supporting the activation of PAG input neurons. We also demonstrated that blockade of mGluR5 receptors, especially in the VL-PAG, abolished the analgesic effect of AcAP, corroborating the critical role of glutamatergic neurotransmission in the VL-PAG during AcAP challenge. These results are consistent not only with the previously described decrease in BOLD signals but also with findings from the literature. Indeed, the chemoarchitecture within the PAG reveals the high abundance of GABA-positive cells throughout the PAG (Williams and Beitz, 1990), while the number of activated glutamatergic output neurons is low (Loyd et al., 2007). This limited number of glutamatergic output neurons responsible for activation of the descending pathways suggests that the decreased activity of GABA neurons, induced by AcAP, could account for the decrease of BOLD signal and c-Fos labeling in our study. Interestingly, previous studies showed a similar profile in response to morphine, which, when systemically administered, inhibited GABA release within the PAG (Renno et al., 1992) while reducing the BOLD signal (Becerra et al., 2006).

Together, these data demonstrate the critical role of the PAG in the effects of AcAP, in which AcAP supports glutamatergic neurotransmission and decreases GABAergic tone to disinhibit PAG; this could eventually activate inhibitory descending pathways. This PAG-based mechanism may underlie the effect of AcAP which, metabolized into AM404, recruits brain CB1 and TRPV1 receptors and requires the activation of inhibitory descending serotonergic pathways (Mallet et al., 2008; Barrière et al., 2013) to induce analgesia.

3. The TRPV1-mGluR5-PLC-DAGL-CB1 signaling cascade in the VL-PAG is involved in AcAP-induced analgesia

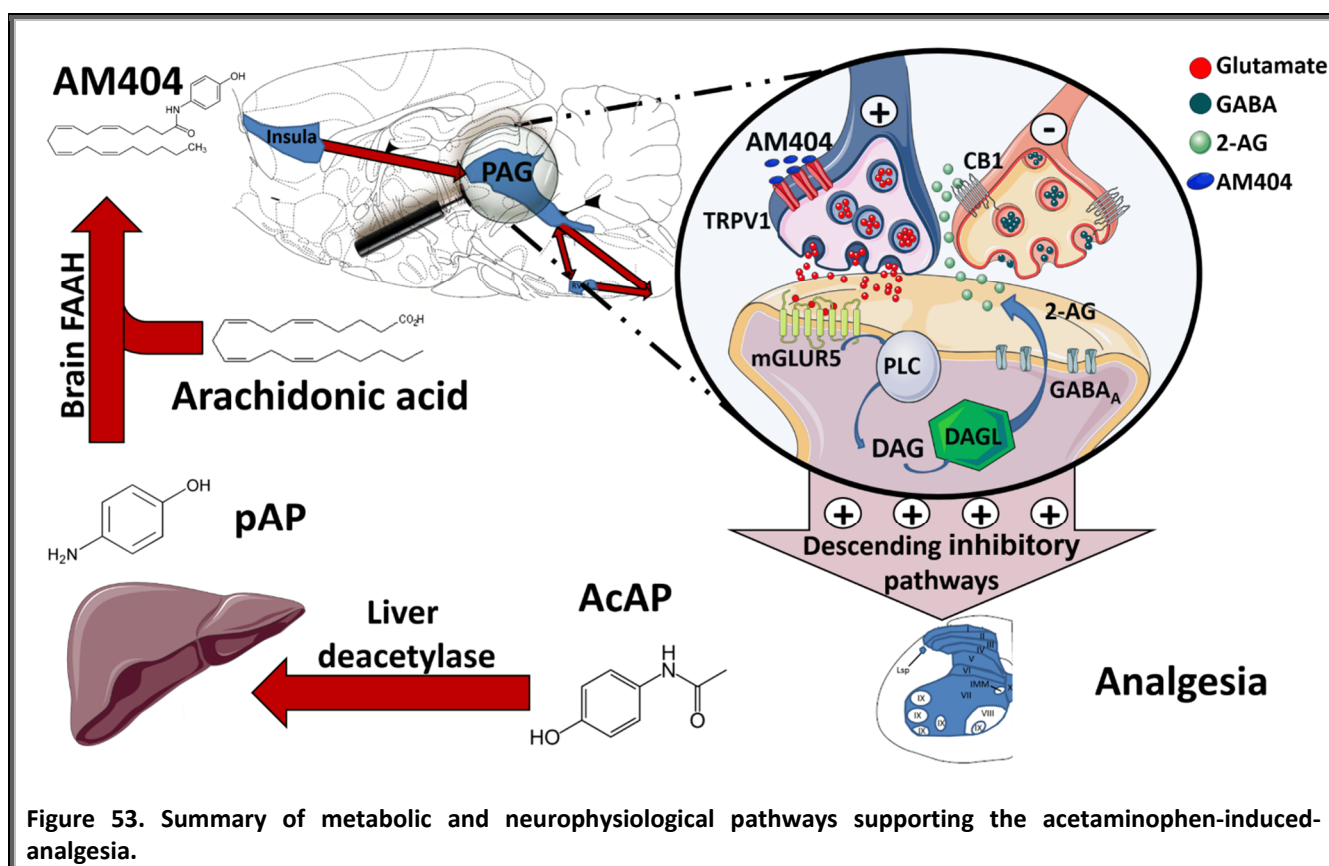
Hence, the final objective of this work was to determine the precise mechanism of action of AcAP in the VL-PAG with respect to our previous findings and to demonstrate that this mechanism could support its analgesic effect. First, we demonstrated that the proteins required for AcAP-induced analgesia (FAAH, CB1 and TRPV1) were present and colocalized in VL-PAG neurons showing that the final metabolite of AcAP, AM404, should be synthesized by FAAH near CB1 and TRPV1. We also demonstrated that oral AcAP administration induced analgesia through CB1 and TRPV1 receptors within the VL-PAG. However, AcAP directly injected into the VL-PAG failed to induce analgesia, but its first metabolite, pAP, induced an analgesic effect that depended on FAAH. Finally, when directly injected into the VL-PAG, AM404 also induced analgesia through a CB1- and TRPV1-dependent mechanism. These data demonstrate the key role of the endocannabinoid system in VL-PAG to initiate the analgesic effect of AcAP and confirm our previous results suggesting that AcAP acts as a pro-drug. These data are consistent with those obtained previously (Maione et al., 2006; Starowicz et al., 2007; Palazzo et al., 2008; Liao et al., 2011), demonstrating that ventrolateral columns of the PAG supported a CB1- and TRPV1-induced analgesia. However, it has been reported that dorsolateral but not ventrolateral PAG were involved in CB1-dependent analgesia (Hohmann et al., 2005; Suplita et al., 2005). However, this work was conducted in the specific model of stress-induced analgesia, which may explain why a different part of PAG was involved. Moreover, McGaraughty et al. (2003) reported that capsaicin, when injected into the dorsal PAG, activates TRPV1-expressing pronociceptive neurons rather than antinociceptive output neurons.

The involvement of TRPV1 receptors within the VL-PAG in the analgesic effects of AcAP and its active metabolite, AM404 (which is a potent ligand of TRPV1 receptors), may be linked with the currently described glutamate release in this structure. Indeed, capsaicin (a TRPV1 agonist) facilitates glutamate release in PAG (Xing and Li, 2007) and promotes analgesia through group I metabotropic glutamate receptors (Palazzo et al., 2002) and, notably, through mGluR5 receptors (Liao et al., 2011). Accordingly, we demonstrated that inhibiting the mGluR5 receptor in the VL-PAG decreases AcAP-induced analgesia. These findings indicate the essential involvement of glutamatergic neurotransmission within the VL-PAG in the analgesic effect of AcAP.

Additionally, Liao *et al.* (2011) also demonstrated that mGluR5 activation promotes the biosynthesis of 2-AG by DAGL through a PLC-dependent mechanism that is responsible for the retrograde inhibition of GABA release through presynaptic CB1 receptors (Liao et al., 2011). Because the level of GABA decreases during an AcAP challenge and because its analgesic effect depends on CB1 and mGluR5 receptors within the VL-PAG, we hypothesized that the mechanism described by

Liao *et al.* might be involved in the analgesic effect of AcAP. This hypothesis is confirmed through the inhibition of AcAP-induced analgesia by specific inhibitors of PLC and DAGL.

In conclusion, based on our previous demonstration of a central analgesic effect of AcAP, we showed here, for the first time, that VL-PAG-located sequential neurochemical events contribute to this effect (**Figure 53**). The active metabolite of AcAP, AM404, which is produced by FAAH in VL-PAG, activates presynaptic TRPV1 receptors, thereby inducing glutamate release from PAG input neurons. Glutamate spillover activates mGluR5 post-synaptic receptors and consequently reduces GABA levels through a PLC-DAGL-2AG-dependent pathway. Finally, this complex mechanism disinhibits the PAG-RVM output neurons, which could promote activation of the descending inhibitory pathways previously shown to be involved in the analgesic effect of acetaminophen both in animals (Tjolsen *et al.*, 1991; Mallet *et al.*, 2008) and humans (Pickering *et al.*, 2008). The pro-drug profile of AcAP and the possibility of specifically targeting the endovanilloid/endocannabinoid systems in the VL-PAG should be addressed to facilitate the development of new analgesic compounds.



***DONNEES COMPLEMENTAIRES NON
PUBLIEES***

I. Introduction

Des expérimentations complémentaires ont été effectuées lors de mes travaux de thèse. Cependant, les données supplémentaires obtenues n'ont pu être intégrées aux articles précédemment détaillés. Nous avons en effet étudié le rôle des acteurs clés du paracétamol dans la SGPA en condition pathologique suivant une autre voie d'administration qui s'astreint de l'effet de premier passage hépatique, la voie i.v. Nous avons également évalué si l'AM404 conserve son effet antinociceptif dépendant des récepteurs CB1 et TRPV1, lors de son administration dans la vl-SGPA et en condition pathologique. Enfin, nous avons étudié l'impact du paracétamol sur les voies descendantes sérotoninergiques grâce à la méthode de la microdialyse spinale et cérébrale.

II. Matériels et méthodes

Les données expérimentales concernant les animaux, les drogues et les microinjections dans la vl-SGPA, les tests comportementaux ont été précédemment explicités (Cf. **2^{ème} article.III. Materials and methods**).

1. Induction du modèle de monoarthrite

L'induction du modèle de monoarthrite chez le rat fait suite à une administration de 30 µL d'ACF (Difco laboratoire, États-Unis). Le site d'injection se situe dans la cavité articulaire de la cheville droite de l'animal. La procédure d'injection est effectuée sous une anesthésie brève (isoflurane, induction à 2%). Des seuils de réponse au test de pression de la patte sont établis, avant administration d'ACF puis 7 jours après l'injection, afin de mesurer l'hyperalgie mécanique.

2. Microdialyse cérébrale et spinale

a. Procédure chirurgicale

Les rats (microdialyse cérébrale : 250-275 g et microdialyse spinale : 225-250 g) sont préalablement anesthésiés à l'aide de xylazine/kétamine (Rompun 2%, 10 mg/kg, i.p. ; Imalgène1000, 75 mg/kg, i.p.). En cas de prolongation de l'acte chirurgical, une dose supplémentaire de kétamine peut être administrée si besoin. Les rats sont placés dans un cadre de stéréotaxie et fixés grâce aux barres d'oreilles et à la barre de dents dans le cas d'une microdialyse cérébrale. Dans le cas d'une microdialyse médullaire, des crochets sont utilisés pour fixer la colonne vertébrale de l'animal (Stoelting, Wood Dale, Illinois, USA).

Microdialyse de la vl-SGPA : Après avoir enlevé les tissus recouvrant l'os du crâne, l'extrémité d'une canule guide (CMA11) est placée au niveau du Bregma représentant le point zéro des coordonnées stéréotaxiques. Les coordonnées appliquées pour se placer au niveau de la vl-SGPA sont : Antéropostérieur = -7,8 mm ; Latéral = 2,0 mm ; Ventrolatéral = -4,2 mm (par rapport aux méninges). Un angle de 14,5° est appliqué par rapport au plan horizontal. Deux vis d'ancrage sont disposées sur l'os du crâne pour consolider l'ensemble du dispositif avec un ciment dentaire. La peau est ensuite suturée pour recouvrir le dispositif. Un traitement local antibiotique est appliqué en spray (thiamphénicol, Négérol®, 0,095 mg/ml) et un traitement anti-inflammatoire non stéroïdien est administré le jour de la chirurgie puis le lendemain (méloxicam, 2 mg/kg, s.c.).

Microdialyse spinale : Une canule guide (CMA11) est insérée au niveau de la corne dorsale du segment L4 de la moelle épinière (vertèbre T13, dans les couches 2 et 3 de Rexed) (**Figure 54**). Le choix de cette localisation est dû aux mouvements moindres de la colonne vertébrale à ce niveau, favorisant de ce fait l'ancrage et le maintien de la canule. Le point zéro de référence pour la mesure des coordonnées stéréotaxiques est l'apex du processus épineux de T13. Les coordonnées appliquées sont alors : Antéropostérieur = 4,0 mm ; Latéral = 0,64 ± 0,14 mm ; Profondeur = 0,72 ± 0,06 mm (de la dure-mère), avec un angle de 16° par rapport au plan horizontal (Gerin et al., 2008). La canule guide est fixée à la vertèbre grâce à des vis d'ancrage et du ciment dentaire pour maintenir cet ensemble. La peau est suturée à l'aide d'agrafes de Michel (A75 Perfect, France). Les animaux sont traités avec un spray antibiotique à base de thiamphénicol (Négérol®, 0,095 mg/ml) et un anti-inflammatoire stéroïdien administré par voie intramusculaire à (dexaméthasone, 2 mg/kg, i.m.).

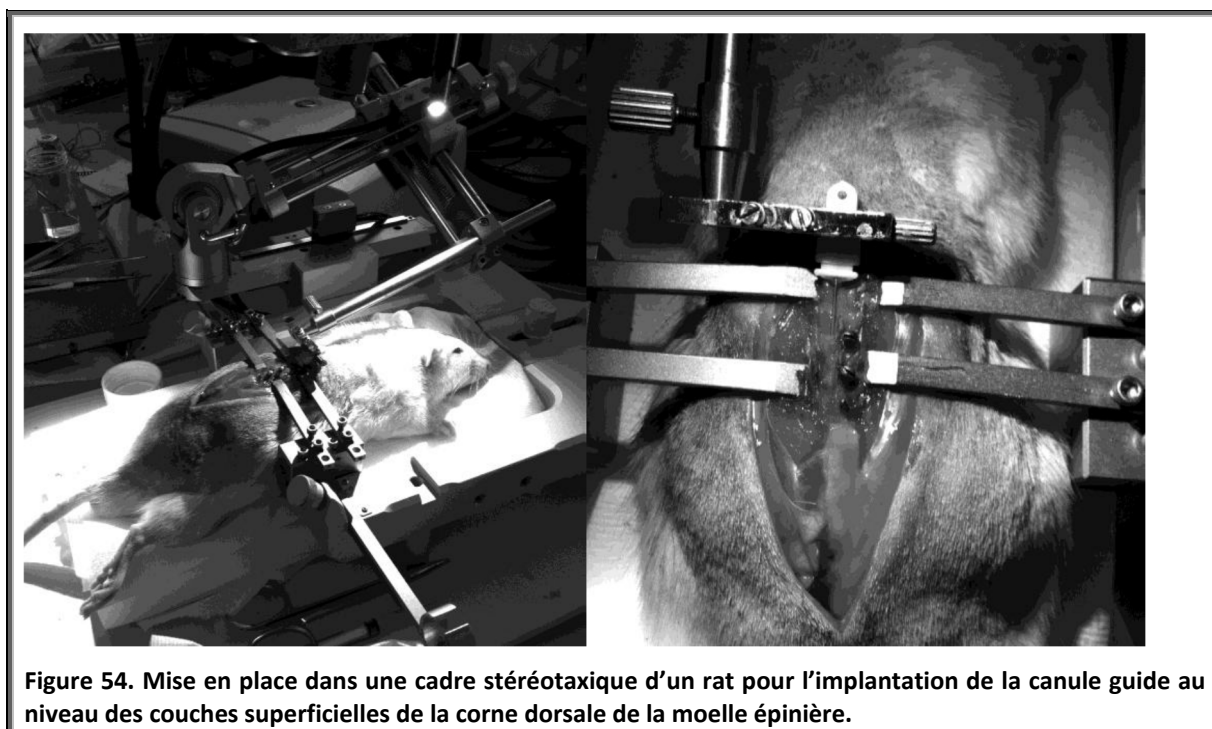


Figure 54. Mise en place dans une cadre stéréotaxique d'un rat pour l'implantation de la canule guide au niveau des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière.

b. Recueil des échantillons

Une période de récupération de 7 jours suivant l'opération cérébrale et 10 jours suivant l'opération spinale est préconisée pour permettre aux animaux de se rétablir. Les animaux sont placés la veille de l'expérimentation, pour habituation, dans une cage adaptée pour animal vigile (CMA120) avec de la nourriture et de l'eau *ad libitum* (**Figure 55A**). Le jour de l'expérimentation, les rats sont anesthésiés brièvement par inhalation d'isoflurane (4% pour induction) afin d'introduire une sonde de microdialyse (CMA11, spinale : longueur de 1 mm ou cérébrale : longueur de 2 mm, diamètre de la membrane semi-perméable 240 μm , « *cut-off* » de 6000 Da, CMA/microdialysis, Nortj Chelmsford, MA). La sonde est ensuite reliée au circuit puis perfusée (**Figure 55B**) avec une solution de Ringer stérile (Na = 147 mM, K = 4 mM, Ca = 2,25 mM, Cl = 155,5 mM, + 0,25 mM d'acide ascorbique, Macopharma, France). Le débit de perfusion est de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ pour la dialyse spinale et de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ pour la dialyse de la vl-SGPA. Une période de « *washout* » de 2h est préconisée avant de recueillir les 6 échantillons considérés comme valeurs de base (1 aliquot/15 min pendant 1h30). Les animaux reçoivent ensuite un traitement de paracétamol (300 mg/kg, *p.o.*), puis les échantillons sont collectés pendant 2h (1 aliquot/15 min).

Les rats sont sacrifiés à la fin de l'expérimentation par une injection létale de pentobarbital sodique (100 mg/kg, *i.p.*). Les renflements lombaires ou les cerveaux sont récupérés afin de vérifier et valider la localisation des sondes.

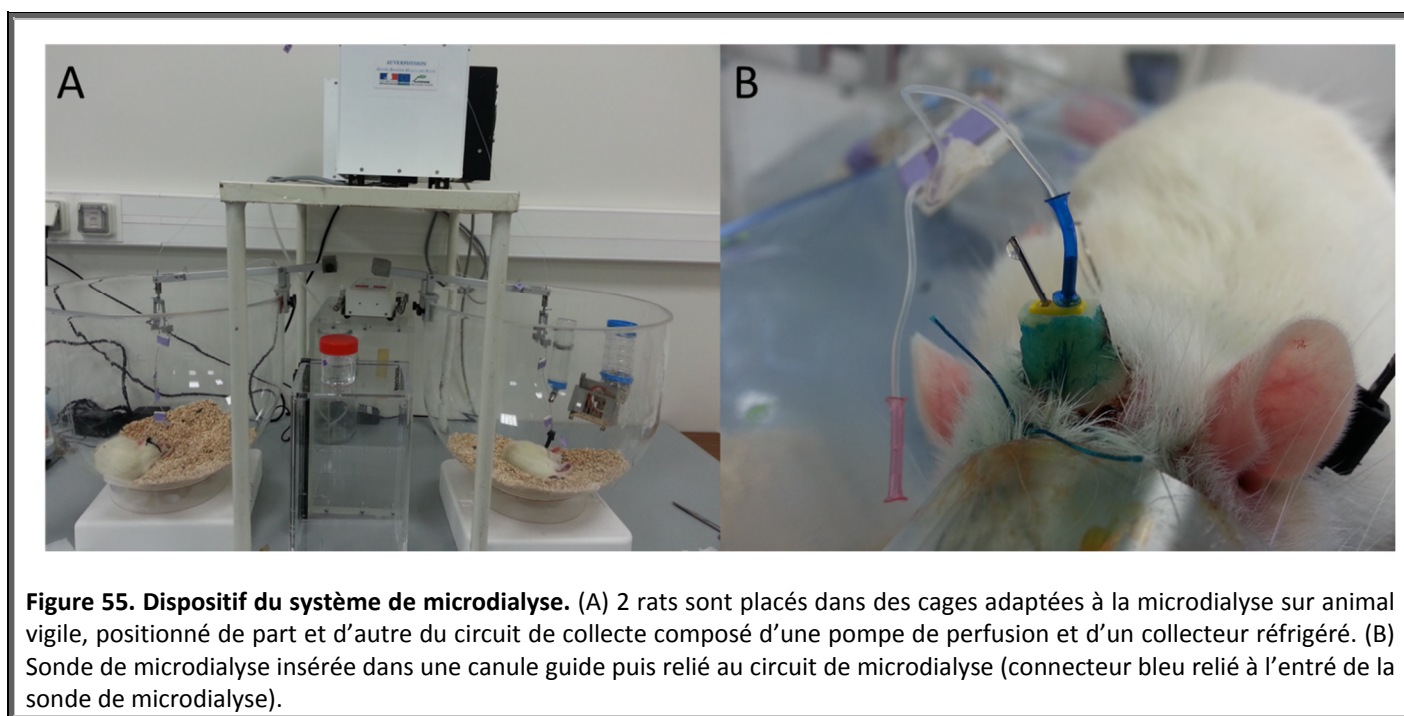


Figure 55. Dispositif du système de microdialyse. (A) 2 rats sont placés dans des cages adaptées à la microdialyse sur animal vigile, positionné de part et d'autre du circuit de collecte composé d'une pompe de perfusion et d'un collecteur réfrigéré. (B) Sonde de microdialyse insérée dans une canule guide puis reliée au circuit de microdialyse (connecteur bleu relié à l'entrée de la sonde de microdialyse).

c. Dosage des molécules d'intérêt

Les échantillons collectés sont stockés à -80°C avant le dosage. Dix microlitres d'échantillons sont injectés pour séparation en chromatographie liquide à haute performance (HPLC, Shimadzu Corp. États-Unis). La 5-HT et son métabolite 5-HIAA ainsi que le paracétamol et le p-aminophénol sont séparés selon un mode gradient basé sur leurs propriétés physico-chimiques grâce à une colonne phase inverse Hypersil PFP (150×2,1 mm, 5 µm ; Thermo Fisher Scientific, USA). La phase mobile utilisée est composée d'un solvant A (0,1 % (v/v) acide formique dans eau) puis d'un solvant B (0,1 % (v/v) acide formique dans acétonitrile) et le débit est réglé à 200 µl/min. Ce système de chromatographie est couplé directement à un spectromètre de masse (système 5500 Qtrap triple quadripole linear ion trap, AB Sciex).

Les molécules sont ionisées en mode ESI (*electrospray ionisation*) à l'aide d'une source Turbo IonSpray (ABSciex, CA) arrivant sous forme liquide en sortie de chromatographie, elles passent à l'état gazeux au niveau de la source d'ionisation. Cette source d'ionisation permet de charger la molécule en positif ou en négatif et l'ion résultant va être séparé dans le spectromètre de masse en fonction de son rapport masse sur charge (m/z). Le voltage de la source est de + 2500 V et sa température de 500°C. Le spectromètre de masse de type triple quadripôle est constitué de trois quadripôles en série et le mode utilisé est le mode MRM (*multiple reaction monitoring*) : dans le premier quadripôle un filtre est appliqué pour ne laisser passer que la masse de la molécule d'intérêt, dans le second quadripôle la molécule est fragmentée puis dans le dernier quadripôle un second filtre est appliqué pour ne laisser passer que la masse d'un fragment spécifique de la molécule d'intérêt.

Il en résulte un signal en fonction du temps dont il faut comparer l'aire sous la courbe à celle d'une droite étalon pour définir la concentration de la molécule d'intérêt dans l'échantillon de microdialyse. Ainsi, nous avons quantifié la concentration en ng/ml de 5-HT et 5-HIAA collecté dans chacun des échantillons. Nous avons aussi suivi l'apparition du paracétamol et du p-aminophénol grâce à l'« *area ratio* » qui correspond à la différence entre l'aire sous la courbe (AUC pour « *area under the curve* ») de l'étalon interne et l'AUC de la molécule d'intérêt. Les limites de quantification (LOQ) sont de respectivement 0,025 ng/ml pour la 5-HT, et de 0,25 ng/ml pour le 5-HIAA.

3. Statistiques

L'ensemble des données expérimentales est exprimé en moyennes \pm E.S.M. Les valeurs provenant du test de pression de la patte sont exprimées en seuils de réponses nociceptives obtenues (retrait de la patte) pour un poids appliqué sur la patte en gramme. Les résultats obtenus en microdialyse sont exprimés en ng/ml ou en % de variation par rapport à la moyenne des seuils de base rapportés à 100%. Le suivi en microdialyse de l'apparition du paracétamol et du p-aminophénol est représenté par l'aire sous la courbe du signal obtenue par chacune des deux molécules.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6. Une analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs à mesures répétées suivies d'un test *post-hoc* de Bonferroni a été utilisé pour l'analyse des expérimentations comportementales. Les données de microdialyse concernant la 5-HT et 5-HIAA n'ont pas permis d'effectuer d'études statistiques par manque d'effectif. Les données pour le paracétamol et le p-aminophénol sont à titre indicatif pour montrer la présence ou non des molécules, aucune donnée quantitative n'ayant été analysée.

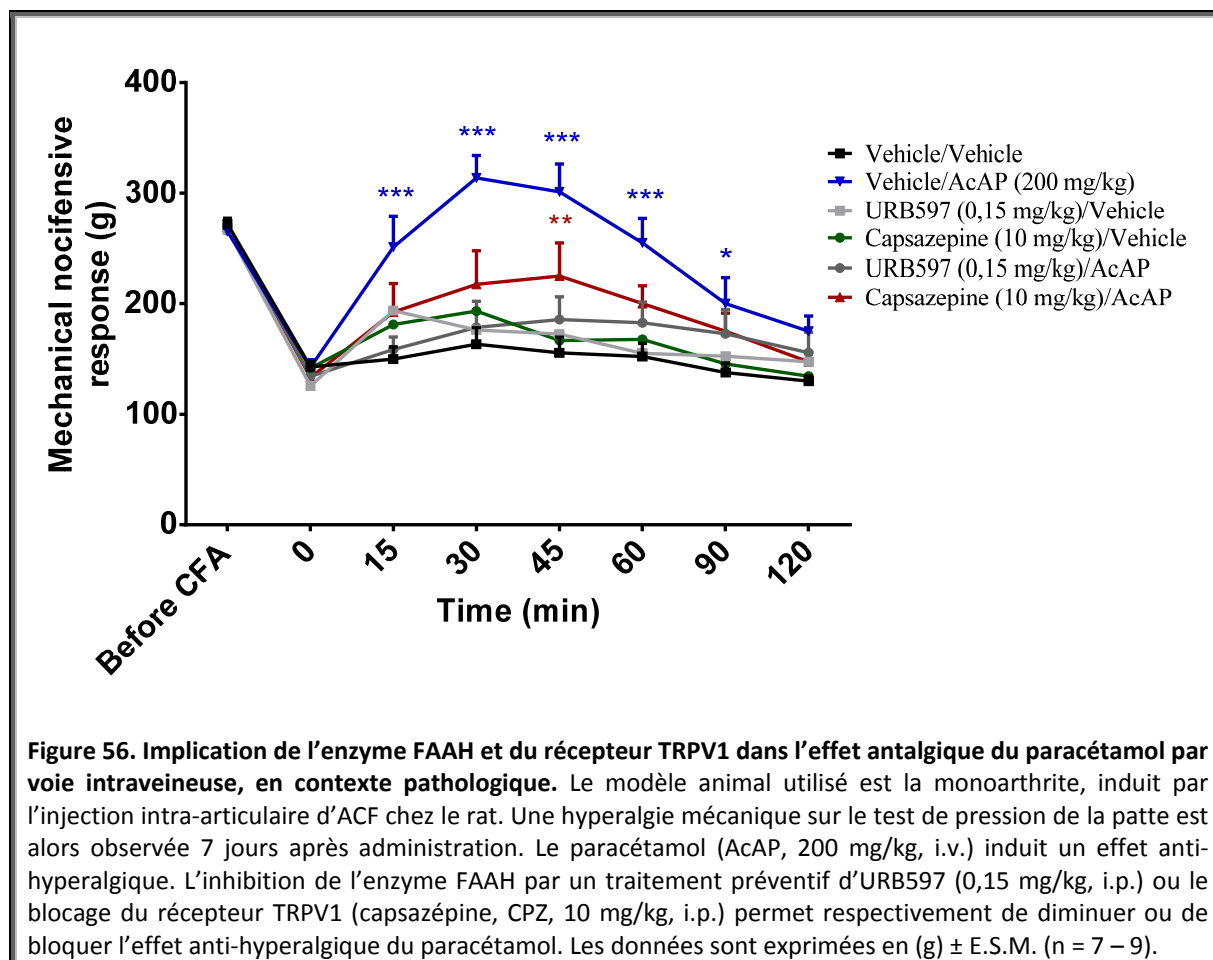
III. Résultats

1. Implication de l'enzyme FAAH et du récepteur TRPV1 dans l'action antalgique du paracétamol par voie intraveineuse ou voie orale

L'ensemble de nos travaux vise à étudier le mécanisme d'action du paracétamol sous sa forme d'usage la plus courante, soit la prise orale. Or, nous ne pouvons pas exclure qu'une autre voie d'administration puisse présenter un tout autre mécanisme. Nous avons donc souhaité voir si l'utilisation du paracétamol par injection intraveineuse, couramment utilisée en milieu hospitalier, implique également un métabolisme FAAH dépendant et cible le récepteur TRPV1 (**Figure 56**). Pour respecter une cohérence entre le contexte d'usage clinique du paracétamol et nos expérimentations, nous avons effectué ce travail sur un modèle de rat douloureux suite à une monoarthrite induite par injection intra-articulaire d'ACF.

Les résultats présentés dans la **Figure 56** montrent que l'administration d'ACF provoque une hyperalgie mécanique qui se traduit par une diminution des seuils de réponse au test de pression de la patte, 7 jours après induction du modèle (avant monoarthrite : $268,8 \pm 1,2$ g vs. après monoarthrite : $136,7 \pm 2,9$ g). Une administration intraveineuse de paracétamol (200 mg/kg) réduit significativement l'hyperalgie mécanique entre 15 et 90 minutes. Un effet maximal est observé 30 minutes après administration de paracétamol, avec une moyenne de $313,8 \pm 20,3$ g ($p < 0,0001$). L'administration préventive (15 minutes avant paracétamol) d'un inhibiteur de l'enzyme FAAH (URB597, 0,15 mg/kg) ou d'un antagoniste des récepteurs TRPV1 (CPZ, 10 mg/kg) induit

respectivement une diminution ou une inhibition de l'effet antalgique du paracétamol. Ces résultats suggèrent que le paracétamol administré par voie intraveineuse conserve un mécanisme d'action antalgique identique à l'utilisation de la forme orale impliquant la FAAH et le récepteur TRPV1.

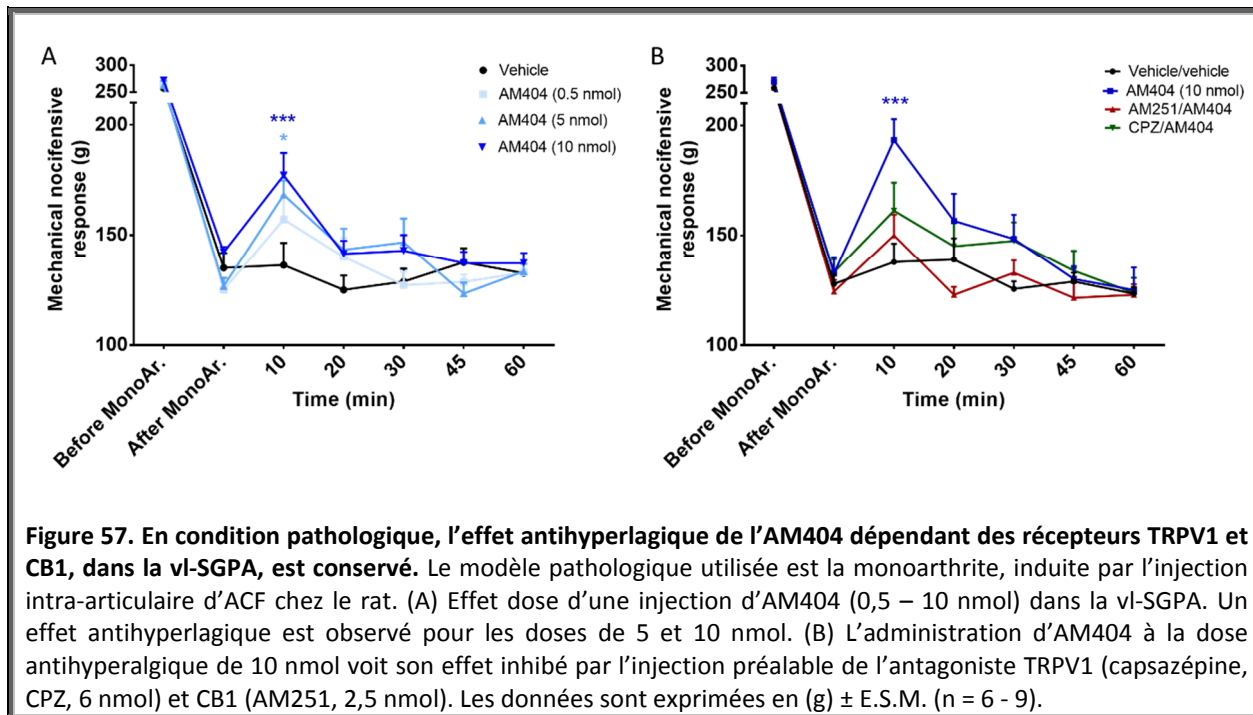


2. Confirmation du rôle antinociceptif de l'AM404 dans la SGPA en contexte pathologique et dépendant des récepteurs TRPV1/CB1

Nos précédentes données ont démontré le potentiel antinociceptif de l'AM404 microinjecté dans la vl-SGPA. Il a aussi été noté que cet effet était dépendant des récepteurs TRPV1 et CB1. L'ensemble des données du 2^{ème} article justifie l'hypothèse selon laquelle l'AM404, issu de la biotransformation du paracétamol en p-aminophénol, serait synthétisé dans la vl-SGPA pour induire son effet antalgique en concomitance avec les récepteurs TRPV1 et CB1. Cependant, aucune de ces données ne vérifie que dans un contexte pathologique, l'AM404 serait à même de produire un effet antalgique lorsqu'il est administré dans la vl-SGPA.

Sur le modèle de douleur monoarthritique induite par injection intra-articulaire d'ACF précédemment utilisé, nous observons qu'une injection AM404 (5 et 10 nmol, doses utilisées dans nos expériences précédentes) dans la vl-SGPA réduit l'hyperalgie mécanique (**Figure 57A**). La **Figure**

57B montre également qu'une co-administration d'AM404 d'une dose efficace (10 nmol) avec un antagoniste TRPV1 ou CB1 dans la vl-SGPA bloque l'effet escompté de l'AM04 administré seule. Il existe donc bien un effet antihyperalgique de l'AM404 dans la vl-SGPA dépendant des acteurs TRPV1 et CB1 en condition pathologique.

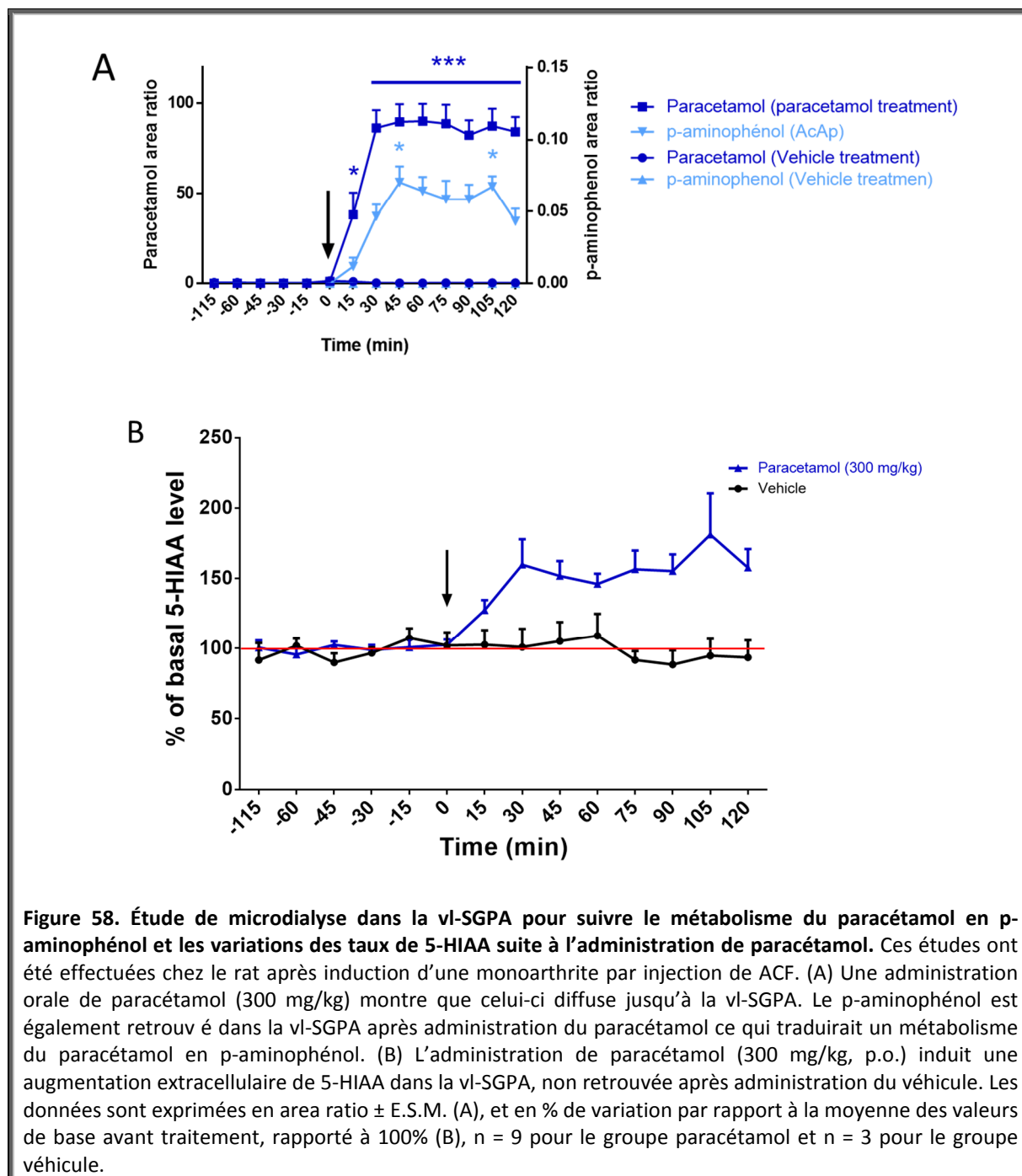


3. Le paracétamol modifie les taux de 5-HT au niveau de la vl-SGPA et de la moelle épinière : étude de microdialyse.

Les données de la littérature concernant l'hypothèse mécanistique du paracétamol indiquent que ce dernier interagit avec le système sérotoninergique. Plus précisément, le paracétamol renforcerait les voies descendantes sérotoninergiques pour limiter l'influx du message nociceptif au niveau médullaire. De nombreux résultats précliniques et cliniques alimentent cette hypothèse. Cependant, les résultats obtenus montrent indirectement l'implication de ce système *via* des lésions de ces voies descendantes sérotoninergiques ou par l'inhibition pharmacologique des récepteurs médullaires à la 5-HT. Dans notre hypothèse, un résultat primordial est alors manquant : nous n'avons aucune preuve directe que le paracétamol induit une augmentation de la 5-HT le long de ces voies descendantes sérotoninergiques.

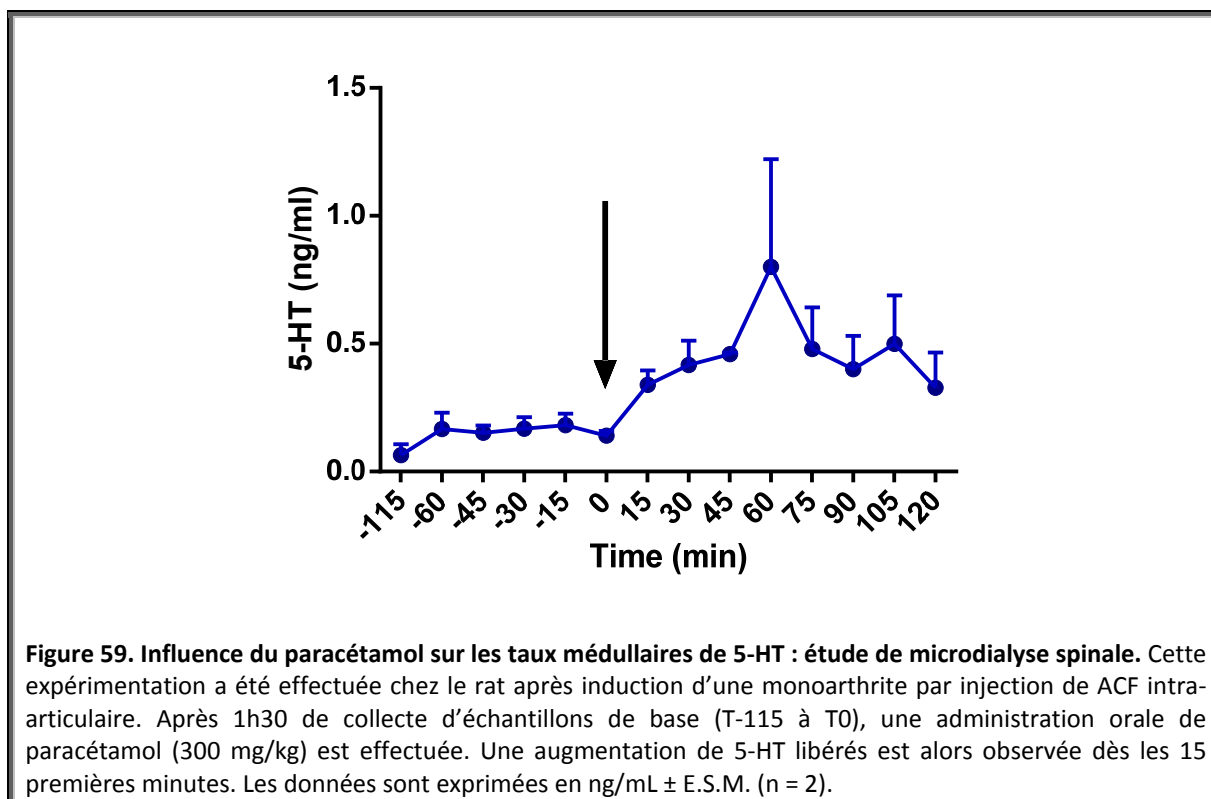
Pour cela, nous avons souhaité mis au point au laboratoire la technique de microdialyse cérébrale (vl-SGPA) et spinale afin de conforter l'influence du paracétamol sur ces voies sérotoninergiques descendantes. Cette technique permet de suivre l'évolution de la libération extracellulaire de différents neurotransmetteurs, dont la 5-HT et le 5-HIAA (un métabolite de dégradation de la 5-HT, Cf. **2^{ème} Chap.II.4.a. La sérotonine : Généralités**). L'ensemble de ces études

de microdialyse a été effectué chez le rat après induction du modèle de monoarthrite. Les résultats obtenus ne sont pour l'instant que descriptifs, aucune donnée n'a été statistiquement analysée. Cependant, les résultats nous indiquent quelques informations intéressantes. Tout d'abord, le paracétamol diffuse rapidement et largement au niveau central, puisque nous notons sa présence au niveau de la vl-SGPA après une administration orale de ce dernier chez le rat (300 mg/kg, **Figure 58A**). Le p-aminophénol est également présent au niveau de la vl-SGPA, mais il apparaît avec un léger décalage par rapport au paracétamol (**Figure 58A**), pouvant s'expliquer par le métabolisme hépatique du paracétamol préalablement requis pour sa synthèse. La présence du p-aminophénol dans la vl-SGPA renforce d'ailleurs l'idée que ce dernier puisse être transformé, par la FAAH *in situ*, en AM404. Nous avons également suivi l'évolution des taux basaux de 5-HT et de 5-HIAA (métabolite de dégradation de la 5-HT) dans la vl-SGPA. Les valeurs moyennes des concentrations de base dans les échantillons de microdialyse sont : $129,5 \pm 9,2$ ng/ml ($n = 3$) pour le groupe véhicule et $54,5 \pm 7,1$ ng/ml ($n = 9$) pour le groupe paracétamol. Les résultats obtenus après administration de paracétamol indiquent une augmentation de la 5-HIAA par rapport aux valeurs de base. L'augmentation de 5-HIAA atteint $159,8 \pm 18,1\%$, 30 minutes après administration du paracétamol. Cet effet n'est pas observé chez les animaux recevant le véhicule du paracétamol (**Figure 58B**). Une tendance similaire est observée pour la 5-HT (résultats non inclus) ; cependant une partie des valeurs quantitatives de 5-HT retrouvée dans les échantillons de microdialyse sont à la limite des seuils de quantifications, ce qui restreint l'interprétation de ces résultats. Ces données indiquent donc une augmentation du produit du métabolisme de la 5-HT (5-HIAA) qui peut indirectement traduire d'une augmentation des taux de 5-HT libérée après administration de paracétamol.



Nous avons également voulu démontrer le concept selon lequel le paracétamol interagirait avec la libération de 5-HT médullaire provenant du renforcement cérébral des contrôles descendants sérotoninergiques. Une étude de microdialyse spinale sur un modèle de rat monoarthrite indique que la concentration moyenne de base retrouvée dans les échantillons de microdialyse est de $0,16 \pm 0,01$ ng/ml (n = 2). Une administration orale de paracétamol à 300 mg/kg induit une augmentation des taux de 5-HT par rapport aux valeurs de base. Hélas, il faut noter que par manque de temps cette étude n'a pas encore pu être terminée.

Les tendances de ces résultats de microdialyse semblent montrer que le paracétamol serait capable de recruter le système sérotoninergique au niveau central dans son mécanisme d'action. Néanmoins, des expérimentations complémentaires seront nécessaires pour confirmer ces résultats.



DISCUSSION GÉNÉRALE

1. Validation du concept d'un promédicament à effet central en contexte pathologique

1. Le mécanisme d'action antalgique du paracétamol via son bioprécurseur est conservé en contexte pathologique

Les données précliniques obtenues jusqu'à présent indiquent que le paracétamol induit un effet antinociceptif dépendant du métabolisme de ce dernier en AM404 (Mallet et al., 2008, 2010). Or, l'ensemble des études *in vivo* a été mené en contexte sain. En aucun cas il n'a été démontré que ce même mécanisme puisse être impliqué dans le traitement de la douleur issue d'une pathologie. Dans les études précliniques visant à explorer les mécanismes d'action de médicaments, il est primordial de se rapprocher au mieux du contexte clinique d'usage de ces agents pharmacologiques. Il est donc devenu incontournable de prendre en considération les mécanismes physiopathologiques mis en place dans certaines pathologies douloureuses. Concernant le paracétamol, son utilisation clinique comme antalgique est très courante, il peut être préconisé par exemple dans les douleurs inflammatoires de type arthrite (Hochberg et al., 2012; Laba et al., 2013; Richette, 2014). Notre 1^{er} objectif a donc été de démontrer que **l'hypothèse mécanistique du paracétamol proposée est valide en contexte physiopathologique** en se focalisant sur une douleur inflammatoire induite par un agent phlogogène.

Le 1^{er} article démontre que chez la souris soumise à une douleur inflammatoire subchronique au niveau de la patte, l'inhibition de l'enzyme FAAH permet de bloquer le potentiel antalgique du paracétamol. Que ce soit une délétion génétique de l'enzyme FAAH (**Figure 37**) ou une inhibition pharmacologique (**Figure 38** et **Figure 39**), l'effet du paracétamol est perdu. Les résultats présentés dans le 1^{er} article de ce manuscrit permettent de généraliser le concept démontré en contexte sain (Mallet et al., 2008) d'un antalgique nécessitant d'être biotransformé à un contexte physiopathologique.

Quid du mécanisme antalgique du paracétamol par la voie d'administration intraveineuse

L'efficacité clinique du paracétamol administré par la voie i.v., notamment pour les douleurs postopératoires (McNicol et al., 2011), soulève une question, puisque en effet, cette voie d'injection s'astreint de l'effet de premier passage hépatique. Or, selon notre hypothèse, l'effet antinociceptif du paracétamol par voie orale implique nécessairement ce premier passage hépatique pour former l'intermédiaire métabolique p-aminophénol (Högstätt et al., 2005). Un autre mécanisme serait-il mis en jeu ?

Les résultats complémentaires présentés dans la **Figure 56** indiquent que le paracétamol, administré par la voie i.v., exerce son action antalgique *via* la même voie métabolique et les mêmes acteurs que la voie d'administration orale. En effet, l'action antinociceptive du paracétamol est bloquée par l'inhibiteur de l'enzyme FAAH (URB597, 0,15 mg/kg, i.p.). De plus, l'administration d'un antagoniste des récepteurs TRPV1, également impliqué dans le mécanisme que nous proposons (Mallet et al., 2010), est à même de bloquer l'action antalgique du paracétamol administré par voie i.v. Ces résultats suggèrent donc que l'effet antalgique du paracétamol par la voie i.v., en condition pathologique, implique un mécanisme similaire à la voie d'administration orale.

Concernant l'efficacité du paracétamol par les autres voies d'administration (i.v., sub-muqueuse, Pickering et al., 2014) qui s'astreignent du premier passage hépatique, l'application de notre modèle mécanistique ne semble pas indiquée. Il se pourrait cependant que le mécanisme implique plutôt un déacylation localisé du paracétamol par un autre tissu (Pickering et al., 2014) ou une distribution rapide dans le compartiment sanguin du paracétamol pourrait expliquer une prise en charge hépatique.

2. Le paracétamol est un antalgique aux effets antalgiques strictement centraux

Les travaux tendant à prouver que l'action antinociceptive du paracétamol implique un mécanisme périphérique anti-inflammatoire persistant (Dani et al., 2007; Rezende et al., 2008; Arun et al., 2013). L'hypothèse controversée du mécanisme périphérique est cependant désuète puisqu'un autre mécanisme a été mis en avant : le paracétamol implique une action centrale *via* le système sérotoninergique. En effet, l'action antalgique d'une administration systémique de paracétamol est dépendante du système sérotoninergique et plus particulièrement des contrôles descendants sérotoninergiques (Alloui et al., 2002; Pickering et al., 2006, 2008; Dogrul et al., 2012a). Tandis que les effets locaux du paracétamol ne sont pas dépendants du système sérotoninergique (Bonnefont et al., 2003a).

L'objectif de ce 1^{er} article a été de **confirmer que le mécanisme du paracétamol implique un effet central dépendant l'enzyme FAAH cérébrale**, en contexte de **douleur pathologique**. L'implication de l'enzyme FAAH dans le mécanisme d'action antalgique du paracétamol, et de son métabolite intermédiaire p-aminophénol, a déjà été montré auparavant (Mallet et al., 2008; Barrière et al., 2013). Cependant, aucune précision sur son implication cérébrale n'avait été apportée. Nous en sommes venus à nous poser la question de son implication cérébrale en condition pathologique suite aux résultats des travaux de Ruggieri et al. (2008). En effet, cette étude a constaté qu'une administration de paracétamol par voie systémique (400 mg/kg, i.p.) permettait de retrouver le

métabolite AM404 dans le plasma circulant, suggérant alors que ce dernier n'était pas spécifiquement formé au niveau cérébral. Il faut cependant noter que dans cet article, la quantité de paracétamol administré était particulièrement élevée, produisant généralement des effets locomoteurs (Mallet et al., 2008). Il était cependant nécessaire de confirmer que le mécanisme antalgique du paracétamol est central *via* l'enzyme FAAH cérébrale.

Ainsi, nos résultats obtenus ont fait appel à une stratégie pharmacologique originale afin de démarquer l'effet antinociceptif central du paracétamol de l'effet périphérique. En effet, nous avons sélectivement inhibé soit l'enzyme FAAH strictement périphérique par l'inhibiteur URB937 ne passant pas la BHE, soit la FAAH périphérique et centrale par l'URB597, un autre inhibiteur passant la BHE. Les résultats démontrent que nous avons une implication strictement supra-spinale de l'enzyme FAAH, confirmé par l'administration cérébrale de l'URB937 qui inhibe alors l'action du paracétamol (Dalmann et al., 2014).

Nous apportons ainsi une preuve supplémentaire de l'action centrale du paracétamol en démontrant que les effets antihyperalgiques et antialloodynes du paracétamol dépendent de l'enzyme FAAH cérébrale.

3. Intérêt thérapeutique des inhibiteurs de la dégradation des endocannabinoïdes dans le traitement de la douleur

L'inhibition de l'enzyme FAAH n'est pas dénuée d'effet sur la douleur. Cette enzyme est entre autres impliquée dans la dégradation des endocannabinoïdes AEA et 2-AG (Luchicchi and Pistis, 2012). Plusieurs articles relatent un phénotype hypoalgique des souris FAAH^{-/-} (Lichtman et al., 2004). L'enzyme FAAH se présente comme une cible pharmacologique d'intérêt dans le traitement de la douleur. La modulation de son activité permet d'influencer sur les taux de ces cannabinoïdes endogènes, reconnue pour leur bénéfice dans le soulagement de la douleur. Les récepteurs CB2 sont particulièrement impliqués dans les effets anti-inflammatoires périphériques de par leur présence majoritaire sur les cellules immunitaires (Galiègue et al., 1995; Cabral et al., 2008). Les récepteurs CB1 sont quant à eux très représentés au niveau central et sont également exprimés au niveau périphérique (Pertwee, 1997; Marzo et al., 2004). Les récepteurs CB1 et CB2 sont donc une cible de choix dans le traitement de la douleur. Des essais précliniques et cliniques ont montré l'efficacité du cannabis et de son principe actif Δ^9 -THC (Karst et Wippermann, 2009). Cependant, les effets antinociceptifs de ces derniers sont surplombés par les effets psychotropes des récepteurs CB1 centraux, limitant alors son potentiel thérapeutique (Campbell et al., 2001).

L'intérêt de cette stratégie thérapeutique est motivé par son efficacité sur la nociception. Toutefois, une amélioration du ratio bénéfice risque serait un réel atout pour éviter les effets psychotropes centraux reconnus des cannabinoïdes (Schlosburg et al., 2009).

Une première proposition intéressante a alors été de développer des inhibiteurs de la dégradation des endocannabinoïdes, ayant l'avantage de produire une analgésie par l'augmentation des taux en cannabinoïdes endogènes. Cette méthodologie présente l'avantage d'éviter les effets psychotropes des agonistes cannabinoïdes exogènes (Kathuria et al., 2003; Gobbi et al., 2005; Jayamanne et al., 2006). D'autres inhibiteurs ont montré leurs potentielles antinociceptif tels que l'URB597 (inhibiteur de la FAAH, Kathuria et al., 2003), l'URB602 ou le JZL184 (inhibiteurs de la MAGL, Hohmann et al., 2005; Guindon et al., 2007; Long et al., 2009). En effets, des études précliniques ont montré que l'utilisation de ces inhibiteurs permet dans certains modèles animal de réduire les douleurs inflammatoires et l'inflammation qui en résulte (Cravatt et al., 2004; Jayamanne et al., 2006; La Rana et al., 2006). Un bénéfice est également retrouvé dans des modèles de neuropathie chimio induite (Guindon et al., 2013) ou traumatique (Jayamanne et al., 2006; La Rana et al., 2006). Ces effets endogènes sont attribués au récepteur CB1 et CB2 (Schlosburg et al., 2009).

Cependant, les endocannabinoïdes peuvent également présenter des effets centraux CB1-dépendant, pouvant être néfastes (Flanagan et al., 2006; Clapper et al., 2010; Proudnikov et al., 2010). Afin de pallier à ces éventuels effets centraux, des inhibiteurs de la FAAH, ne passant pas la BHE, ont été développés. Si nous prenons l'exemple de l'URB937, celui-ci à la propriété de ne pas pouvoir passer la BHE. Donc, son champ d'action est restreint à la périphérie (Clapper et al., 2010; Moreno-Sanz et al., 2011; Sasso et al., 2012). Leurs avantages sont de conserver les effets périphériques antinociceptifs/anti-inflammatoires via les récepteurs CB2/CB1, sans interagir avec les récepteurs CB1 centraux responsables des effets délétères qui leur sont attribués (Chiou et al., 2013; Hu et al., 2014).

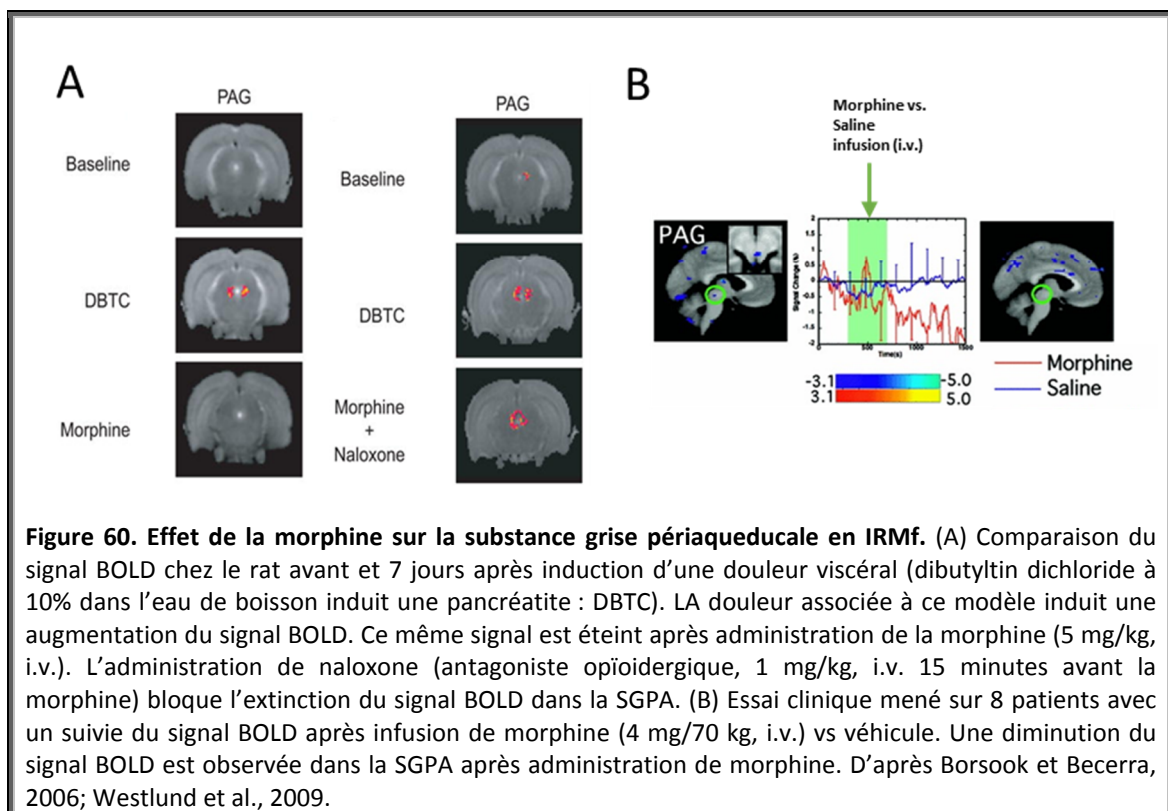
Ainsi, un ciblage thérapeutique du système endocannabinoïdique présente un intérêt dans le traitement de la douleur, mais aussi pour d'autres pathologies (antiémétique, appétit...). Cependant, cette thérapie reste limitée de par ses effets psychotropes. Une stratégie qui consiste à moduler le taux de ces cannabinoïdes endogènes, notamment périphériques, serait une alternative éventuellement mieux tolérée.

II. Mécanisme de l'effet antalgique du paracétamol : une région cérébrale clé et un mécanisme cellulaire potentiellement impliqué

1. La substance grise périaqueducule grise est une structure essentielle dans le mécanisme d'action antalgique du paracétamol.

D'après les travaux d'IRMf précédemment menés (Cf. 3^{ème} Chap.III.1. Etude IRMf : variation du signal BOLD de la), le paracétamol réduit significativement le signal BOLD de plusieurs régions cérébrales ; certaines étant impliquées dans les processus de la nociception (matrice douleur). Parmi elles, nous nous sommes orientés sur la **SGPA**. En effet, cette dernière structure a un rôle clé dans l'initiation des contrôles descendants sérotoninergiques, et que le paracétamol peut interagir avec ce même système. Afin de confirmer une corrélation entre l'activité de la SGPA et l'effet du paracétamol chez le rat, nous avons comparé l'activité de la protéine c-Fos dans les différentes sous-colonnes de la SGPA entre les animaux se voyant administrer le paracétamol (300 mg/kg, *p.o.*) ou son véhicule. Une diminution significative de l'expression de la protéine c-Fos dans chacune des sous-régions a été notée, après administration du paracétamol. Conjointement aux résultats de l'étude d'IRMf montrant une diminution du signal BOLD de la SGPA par le paracétamol, la diminution de l'expression c-Fos constatée ici suggèrent une diminution de l'état d'activation de cette région par le paracétamol. Or, l'initiation des contrôles descendants sérotoninergique est le résultat d'une activation de la SGPA. Il faut savoir que la SGPA est composée de nombreuses fibres GABAergiques responsables d'un tonus inhibiteur sur la SGPA (Behbehani et al., 1990; Lau and Vaughan, 2014). Nous pensons que la diminution de l'activité cellulaire au niveau de la vl-SGPA est le reflet d'une diminution du tonus GABAergique pour *in fine* activer les projections en direction de la RVM, suivant le circuit des contrôles descendants bulbo-spinaux (Lau and Vaughan, 2014). Des mécanismes similaires ont été observés avec les opioïdes (Renno et al., 1992; Lau and Vaughan, 2014; Wilson-Poe et al., 2014). En effet, la SGPA est une région riche en récepteurs opioïdiques (Wang et Wessendorf, 2002) et certains effets antalgiques des opioïdes tels que la morphine sont attribués à cette levée de l'inhibition GABAergique (Maione et al., 1999; Lau and Vaughan, 2014). Il a été noté qu'une administration systémique de morphine pouvait réduire la libération de GABA au niveau de la SGPA (Renno et al., 1992). Certains articles montrent d'ailleurs des interactions entre le mécanisme du paracétamol et de la morphine (Pini et al., 1997; Raffa et al., 2004), toutefois cette hypothèse est controversée (Pickering et al., 2013). Les travaux d'IRMf de Westlund et al. (2009) ont montré une augmentation du signal BOLD au niveau de la SGPA après induction d'un modèle de douleur viscéral. Mais, lors d'un traitement morphinique, le signal BOLD est éteint (Figure 60A). Ces effets sont

dépendants des récepteurs morphiniques car ils sont bloqués par un prétraitement à la naloxone (antagoniste opioïdérique). Une étude clinique d'IRMf a également étudié l'impact de la morphine sur la SGPA, et il semblerait que **l'activation de la SGPA** par la morphine se traduise par une **diminution du signal BOLD** (Borsook et Becerra, 2006, **Figure 60B**). Une autre étude clinique a cette fois-ci mesurée l'évolution du signal BOLD chez les volontaires sains après une stimulation douloureuse thermique (46°C). Dans un premier temps, une augmentation du signal BOLD est observée **suivie d'une diminution du signal** pendant une phase retardée. Durant cette phase retardée la diminution du signal BOLD pourrait s'expliquer par le recrutement des systèmes endogènes de régulations de la douleur via les contrôles descendants (Becerra et al., 2001). En effet, une stimulation nociceptive recrute dans la SGPA des fibres opioïdériques qui libèrent des opioïdes endogènes capable de réduire le tonus inhibiteur GABAergique (Maione et al., 1999). **Ces données suggèrent que le paracétamol, ou d'autres antalgiques tels que la morphine mobiliseraient un système capable de renforcer les contrôles descendants via la SGPA, et qui se traduirait par une diminution du signal BOLD dans la SGPA.**



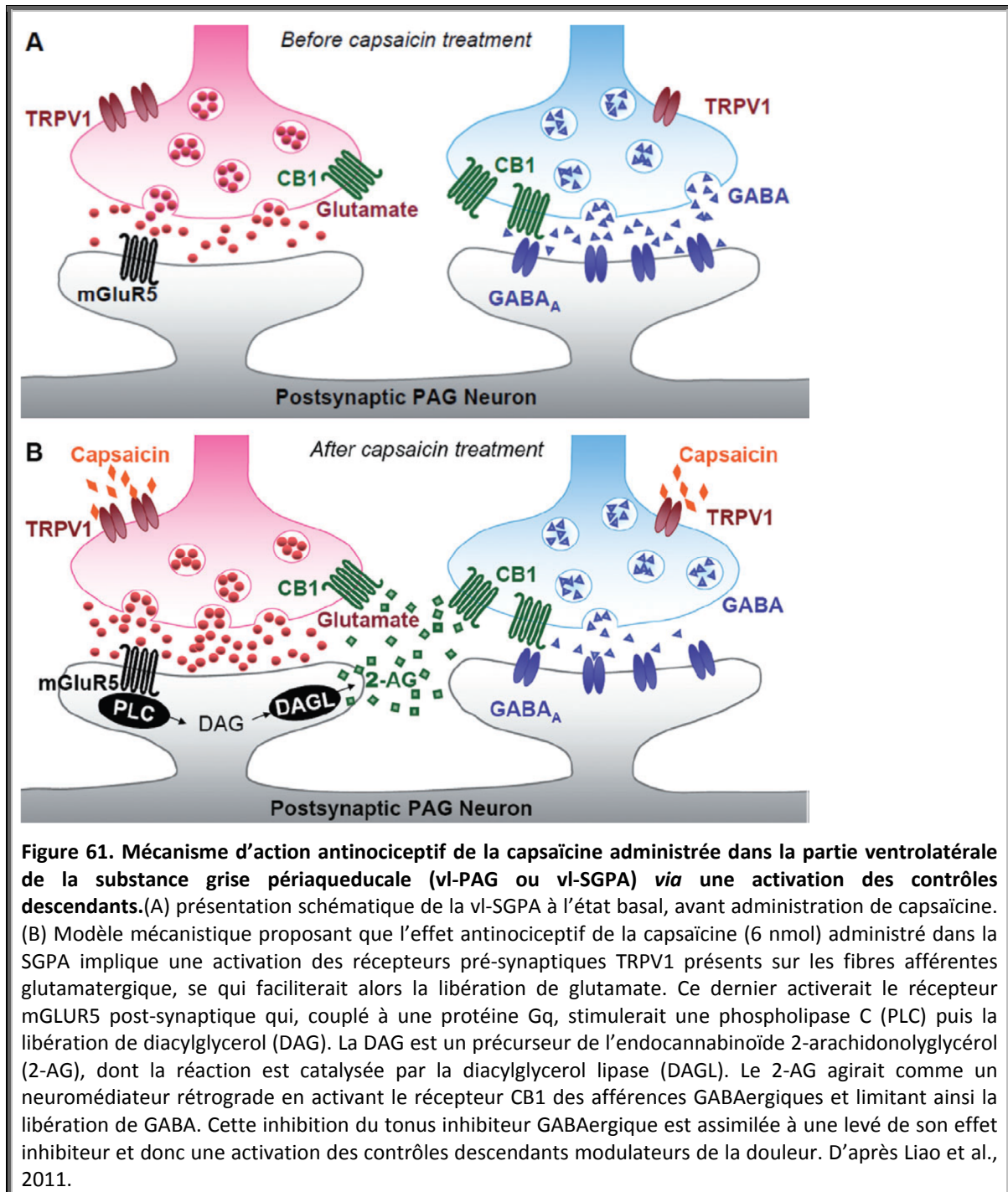
D'autres résultats apportés dans ce manuscrit confirment le rôle de la vl-SGPA dans le mécanisme d'action antalgique du paracétamol. Chacun des acteurs, démontrés comme nécessaires à l'effet du paracétamol, est exprimé dans la vl-SGPA. L'expression de l'enzyme FAAH est colocalisée avec les récepteurs TRPV1 et CB1 dans la vl-SGPA (**Figure 47**). Leurs inhibitions pharmacologiques *in situ* bloquent les effets antinociceptifs du paracétamol par voie orale. Le rôle de ces récepteurs dans

la modulation de la douleur *via* la SGPA a déjà été étudié. Il a été démontré qu'une activation des récepteurs TRPV1 (McGaraughty et al., 2003; Maione et al., 2006; Steenland et al., 2006; Palazzo et al., 2010) ou CB1 (Maione et al., 2006; Palazzos et al., 2006) produisait un effet antalgique par à un renforcement des contrôles descendants. Nous pensons donc que l'AM404, de par ses propriétés, pourrait activer les récepteurs TRPV1 et éventuellement interagir indirectement avec le récepteur CB1. D'autant plus que l'administration de **l'AM404 dans la vl-SGPA induit un effet antinociceptif (Figure 49) et anti-hyperalgique** (sur un modèle de douleur arthrosique, **Figure 57**), dépend des **récepteurs TRPV1 et CB1**. De manière moins précise, nous avons déjà précédemment montré que l'AM404 administrés par voie i.c.v. avait un effet antinociceptif dépend des récepteurs TRPV1 cérébraux (Mallet et al., 2010). Nous avons également montré que le métabolite intermédiaire p-aminophénol pouvait produire un effet antinociceptif dépendant de l'enzyme FAAH dans la vl-SGPA (**Figure 49, Figure 53**). En contrepartie, le paracétamol administré dans la vl-SGPA ne produit aucun effet sur la douleur (**Figure 49**). Un article de Raffa et al. (2000) avait montré un effet similaire puisque l'administration cérébrale de paracétamol ne produisait pas d'effet antinociceptif. Des données obtenues par microdialyse indiquent la présence du paracétamol, mais surtout du p-aminophénol dans la vl-SGPA après une administration orale de paracétamol (**Figure 58A**). **Il apparait clairement que la vl-SGPA intervient dans le mécanisme d'action antalgique du paracétamol via la formation *in situ* d'AM404 et de son action sur les récepteurs TRPV1 et CB1.**

2. Mécanisme cellulaire et voie de signalisation initiée au niveau de la substance grise périaqueducale.

Au même titre que la RVM et ses cellules ON/OFF, la SGPA est à même de moduler la douleur grâce à un équilibre entre un acide aminé excitateur, le glutamate, et inhibiteur, le GABA. À ce niveau, de nombreux systèmes se partagent un rôle pro- ou anti-nociceptif en régulant la libération de glutamate et de GABA (**3^{ème} Chap.II.1. Mécanismes cellulaires mis en jeu dans la modulation des contrôles descendants**). Parmi ceux-ci, il existe une étroite collaboration entre les récepteurs TRPV1 et CB1 dans la modulation des contrôles descendants via ces afférences glutamatergiques et GABAergiques (Maione et al., 2006). À titre d'exemple, il a été démontré que **l'activation des récepteurs TRPV1 dans la vl-SGPA produisait un effet antinociceptif en renforçant la voie bulbo-spinale** (Starowicz et al., 2007; Liao et al., 2011). Des études mécanistiques plus approfondies ont démontré que l'effet antinociceptif d'un agoniste TRPV1 (présent au niveau pré-synaptique des fibres glutamatergiques) est corrélé à une **libération de glutamate** (Palazzo et al., 2002, 2008; Xing et Li, 2007b; Liao et al., 2011). Ce dernier activerait au niveau post-synaptique des récepteurs glutamatergiques mGLUR5, responsable à leurs tours de la stimulation de la synthèse d'un endocannabinoïde : le 2-AG. Cette cascade de signalisation cellulaire détaillée en introduction de ce

manuscrit (Cf. 3^{ème} **Chap.II.1.c. Système mGLUR**) décrit que le 2-AG interagirait alors avec le récepteur CB1 présent sur les fibres pré-synaptiques GABAergique. L'hyperpolarisation induite par l'activation du récepteur CB1 produit une diminution de la libération de GABA limitant son impact inhibiteur sur la SGPA et ces projections vers la RVM (Drew et al., 2008, 2009; Kano et al., 2009; Mitchell et al., 2009; Liao et al., 2011; Lau et Vaughan, 2014). Les travaux de Starowicz et al. (2007) décrivent ce phénomène. L'injection de capsaïcine (6 nmol) au niveau de la SGPA produit une augmentation du relargage de glutamate au niveau de la RVM suivie d'une augmentation de l'activité des cellules OFF et une diminution de l'activité des cellules ON. Ces effets sont dépendants du récepteur TRPV1 puisque la co-administration de la capsaïcine avec un antagoniste TRPV1 (iRTX, 0,5 nmol) ne permet pas de retrouver ces résultats. Ces données montrent que le mécanisme d'action de la capsaïcine implique une collaboration entre récepteurs TRPV1 et CB1 dans la vl-SGPA, permettant d'initier les contrôles descendants pour produire un effet antinociceptif.



Sachant que (1) l'effet antinociceptif du paracétamol **dépend à la fois des récepteurs TRPV1 et CB1**, mais aussi que (2) **l'AM404 issue du paracétamol est un activateur TRPV1**, nous avons suggéré que **l'AM404 puisse à son tour activer ces récepteurs TRPV1 pour initier cette même cascade** (Chiou et al., 2013). Suivant cette démarche, nous avons évalué l'impact du paracétamol sur l'équilibre glutamatergique/GABAergique par le biais d'une technique de RMN spectrométrie. Nos résultats ont tout d'abord montré que le paracétamol pouvait rompre l'équilibre glutamatergique/GABAergique. Nous avons observé une diminution du ratio GABA/glutamate faisant suite à l'administration de paracétamol, résultant d'une augmentation du glutamate et d'une

diminution du GABA. Ces données confortent notre hypothèse, mais une approche pharmacologique et comportementale a permis de conforter l'implication de cette cascade. En effet, l'inhibition, au niveau de la vl-SGPA, de chacun de protagonistes de la voie de signalisation mGLUR5-PLC-DAGL réduit ou inhibe totalement l'effet antinociceptif du paracétamol. Nous avons également montré que l'effet antinociceptif de l'AM404 administré dans la vl-SGPA était dépendant des récepteurs TRPV1 et CB1. Un effet similaire de l'AM404 sur l'endocannabinoïde 2-AG a déjà été observé. Une étude de microdialyse avait révélé que l'administration d'AM404 (10 mg/kg, i.p.) pouvait faciliter l'augmentation des taux de 2-AG au niveau du noyau accumbens (Wiskerke et al., 2012). Il est donc probable qu'un effet similaire puisse être retrouvé dans la SGPA.

Nous proposons donc que cette voie de signalisation, impliquant à la fois TRPV1 et CB1, puisse être une clé du mécanisme cérébrale du paracétamol via son métabolite AM404. En effet, l'AM404 est reconnu comme étant à la fois un activateur des récepteurs TRPV1 et **un inhibiteur de l'AMT** (Beltramo et al., 1997; Zygmunt et al., 2000). Il est donc probable que l'AM404 induise à la fois **une action directe sur les récepteurs TRPV1** mais aussi **une action indirecte via une augmentation des taux d'AEA** (Beltramo et al., 1997; Beltramo and Piomelli, 2000) **et de 2-AG** (Bisogno et al., 2001). Ainsi, de par leurs propriétés, ces deux endocannabinoïdes pourraient à leurs tours activer les récepteurs CB1 et les récepteurs TRPV1 (Zygmunt et al., 2000, 2013). **À ce niveau de détail, les études comportementales justifient difficilement ces mécanismes.** L'utilisation de techniques alternatives comme **l'électrophysiologie**, accompagnée par des études de **microdialyse**, pourrait confirmer l'implication de cette voie de signalisation et apporter des réponses plus précises sur le rôle du 2-AG et éventuellement de l'AEA (Cf. **Perspectives**).

3. Le paracétamol peut-il impliquer d'autres régions cérébrales ?

Les résultats obtenus par IRMf indiquent que d'autres régions cérébrales seraient potentiellement modulées par le paracétamol. Parmi ces structures, nous nous sommes axés sur les régions associées au circuit de la douleur décrit chez l'homme (Apkarian et al., 2005) et le rat (Borsook and Becerra, 2011). Pour l'ensemble de ces structures, la tendance reste la même, à savoir une diminution du signal BOLD dans les régions suivantes (**Figure 44, Figure 45**) : les cortex somatosensoriels, moteur et insulaire, l'amygdale, l'hypothalamus, le thalamus et la SGPA. Au vu de ces résultats, il ne faut pas exclure l'éventualité qu'une ou plusieurs autres régions puissent également être impliquées. Cependant, il faut que celle(s)-ci réponde au même critère que la SGPA, soit une activité enzymatique FAAH dépendante et une expression des récepteurs TRPV1 et/ou CB1 (**Tableau 11**).

Tableau 11. Résumé des régions exprimant la triade TRPV1/CB1/FAAH chez la souris C57BL/6J. Les structures en bleu représentent les régions exprimant les trois protagonistes et présentant une modulation du signal BOLD après administration de paracétamol. D'après Lisboa et Guimarães, 2012; Marsicano and Lutz, 1999; Mezey et al., 2000; Glaser et al., 2006; Steenland et al., 2006; Nguyen et al., 2010; Cavanaugh et al., 2011.

Structures/Régions	Enzyme Fatty-Acid	Récepteur	Récepteur Vanilloïde
	Anime Hydrolase (FAAH)	Cannabinoïde de Type 1 (CB1)	1 (TRPV1)
Néocortex	Cortex somatosensoriel, cortex piriforme, cortex visuel	Cortex moteur, somatosensoriel, cingulaire	Cortex cérébral, Cortex entorhinal, Bulbe olfactif accessoire
Système limbique	Hippocampe	Hippocampe, Amygdale	Hippocampe (Cellules de Cajal-Retzius) gyrus dentelé, Noyau central de l'amygdale
Thalamus et Hypothalamus	Hypothalamus et thalamus	Hypothalamus et thalamus	Thalamus Hypothalamus (noyau Dorsomédian, Noyau Supramammillaire)
Ganglions de la base	Caudate putamen, substantia nigra	Caudate putamen, substantia nigra	Caudate putamen, substantia nigra pars compacta
Mésencéphale	Substance grise périaqueducale	Substance grise périaqueducale	Substance grise périaqueducale, Locus coeruleus, Raphé Rostro linéaire, Colliculus supérieur

Parmi ces structures qui à la fois expriment la triade FAAH/TRPV1/CB1 et sont modulées par le paracétamol (modification signal BOLD), l'hypothalamus et le thalamus semblent présenter un intérêt. Particulièrement, la partie dorsomédiale de l'hypothalamus (DMH) est une structure cérébrale pouvant intervenir dans la modulation de la douleur par les contrôles descendants. Le mécanisme alors mis en jeu peut soit directement faire intervenir la RVM, soit indirectement en relayant par la SGPA, qui est elle-même connectée à la RVM (Heinricher et al., 2009, **Figure 23**). L'article de Chen et al. (2008) confirme par un retraçage que la SGPA, notamment la partie ventrolatérale, est intimement liée avec les différents noyaux hypothalamiques. Il est démontré qu'une désinhibition de la DMH *via* un antagoniste GABA_A (bicuculline) produit une hyperalgie accompagnée d'une activation des cellules ON et une inhibition des cellules OFF de la RVM, traduisant un processus en faveur d'une facilitation de la douleur (Martenson et al., 2009). Les travaux de Pinto-Ribeiro et al. (2013) proposent que l'activation de la DMH (par le glutamate) participe au phénomène d'hyperalgie lors d'une stimulation aiguë, mais n'intervient pas dans les douleurs chroniques. D'après ces données, il est alors **théoriquement probable que la DMH puisse être une cible du paracétamol**. Il devient alors intéressant de confronter le rôle de la DMH dans la pronociception avec nos résultats obtenus en IRMf sur les connectivités fonctionnelles obtenues. En effet, le paracétamol semble atténuer de

nombreux liens fonctionnels entre diverses structures cérébrales. Concernant l'hypothalamus, il apparaît que l'administration de paracétamol ou de son véhicule **n'altère en rien les connectivités fonctionnelles entre l'hypothalamus et la SGPA**. Cependant, **le signal BOLD est diminué par le paracétamol**. Il est donc encore difficile de conclure sur un potentiel mécanisme impliquant à la fois la DMH et la SGPA dans le mécanisme d'action antalgique du paracétamol. D'éventuelles expérimentations complémentaires seront nécessaires afin de clarifier le rôle de la DMH. Notamment, la microinjection d'AM404 dans la DMH sera un résultat clé quant à une supposée implication de cette structure dans l'effet antinociceptif du paracétamol.

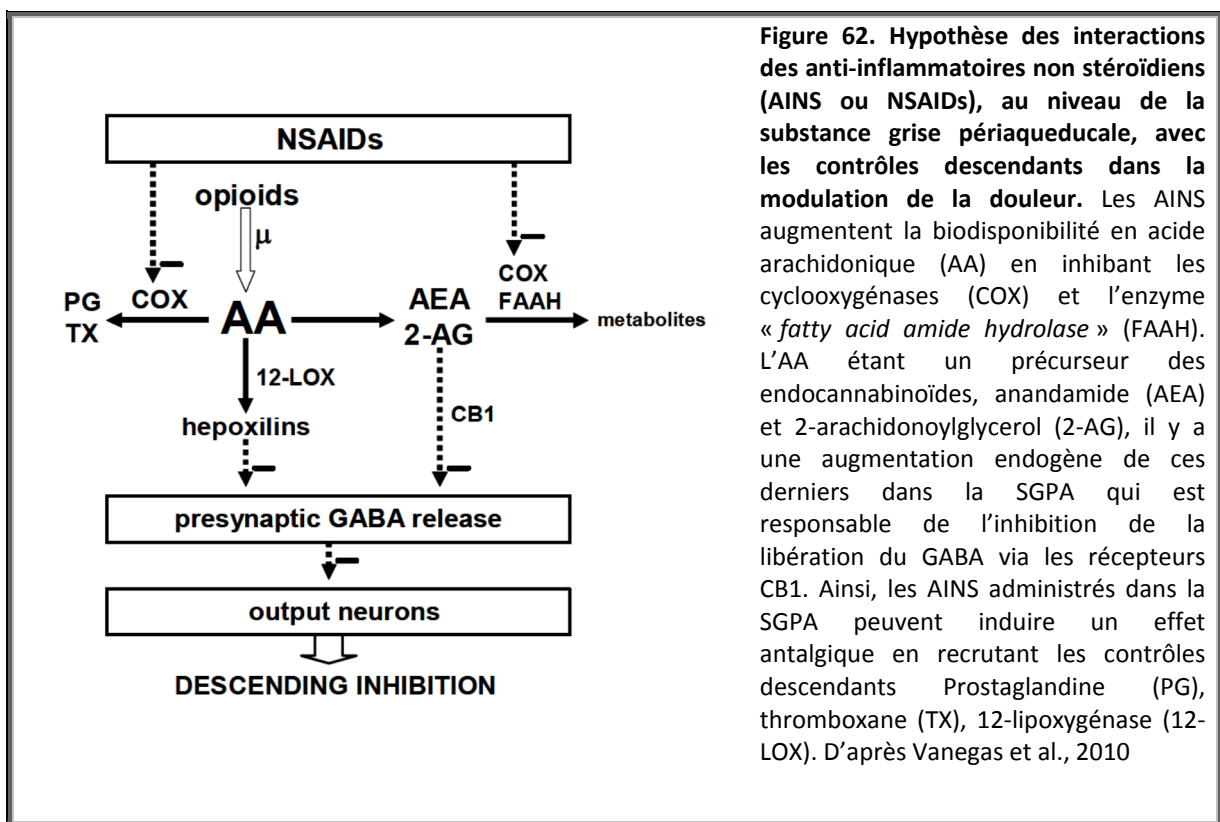
III. La substance grise périaqueducale, un substrat commun à de nombreux antalgiques

De nombreux antalgiques ou autres alternatives thérapeutiques font intervenir la SGPA et les contrôles descendants. Il est maintenant connu que les opioïdes, les cannabinoïdes, les vanilloïdes, les agonistes cholinergiques, les AINS, mais aussi l'effet placebo, la stimulation électrique ou encore l'acupuncture, nécessitent ou mime en partie une activation de ces contrôles descendants sérotoninergiques (Lau et Vaughan, 2008, 2014; Palazzo et al., 2008; Zhao, 2008; Eippert et al., 2009; Ossipov et al., 2010; Vanegas et al., 2010). Par exemple :

1. L'administration dans la SGPA d'agonistes **vanilloïdes** (Palazzo et al., 2002; Liao et al., 2011), **opioïdiques** (Wilson-Poe et al., 2012; Morgan et al., 2014), **cannabinoïdiques** (Kano et al., 2009; Luchicchi et Pistis, 2012; Lau et al., 2014) et **cholinergiques** (Guimarães et al., 2000; Lau and Vaughan, 2008) est connue pour produire des effets antinociceptifs *via* les contrôles descendants. Les mécanismes mis en jeu résultent principalement à une inhibition directe ou indirecte du tonus inhibiteur GABAergique, et donc une activation de de la RVM et du faisceau funiculus dorsolatéral.
2. Le mécanisme d'action **des AINS** implique un effet périphérique, mais également central. Certains auteurs suggèrent que les AINS peuvent recruter les récepteurs CB1 au niveau de la SGPA (Vanegas et al., 2010; Nozadze et al., 2011). Cependant, les AINS n'ont pas d'affinité pour les récepteurs CB1, mais potentialiseraient les systèmes endocannabinoïdiques et opioïdiques pour renforcer les contrôles descendants de la douleur (**Figure 62**).
3. **La stimulation électrique profonde de la SGPA** a déjà fait ces preuves puisque des essais cliniques ont montré le potentiel analgésique de cette méthode (Young et Chambi, 1987; Bittar et al., 2005; Green et al., 2006b, 2007). La stimulation de la SGPA a également des répercussions cardiaques non négligeables, puisqu'en fonction de la zone stimulée, il peut y avoir une bradycardie ou une tachycardie (Green et al., 2005, 2006b, 2007; Linnman et al., 2011).

4. **L'effet placebo** et **l'acupuncture** dépendent également de la SGPA et des contrôles descendants. Il semblerait que dans les deux cas un mécanisme complexe résulterait à renforcer les contrôles descendants *via*, entre autres, le système opioïdologique endogène (Zhao, 2008; Eippert et al., 2009).

Les mécanismes mis en jeu sont alors parfois multiples, mais résultent le plus souvent en une stimulation des contrôles descendants en modulant l'activité de la SGPA via l'inhibition du tonus GABAergique. Il est intéressant de noter que ces mécanismes se rapprochent de celui du paracétamol démontré dans ce manuscrit. La SGPA se positionne alors comme **une cible d'intérêt pour de nombreux antalgiques**. Suivant cette stratégie, il serait intéressant de modéliser des bioprécurseurs capable de répondre à ce mécanisme de pharmacologie vectoriser (Cf. **Perspectives**).



PERSPECTIVES

1. Paracétamol : mécanisme cellulaire mis en jeu dans substance grise périaqueducule et renforcement des voies descendantes sérotoninergiques

1. Exploration de la cascade cellulaire mise en jeu dans la substance grise périaqueducule par le paracétamol

Nos données comportementales recueillies chez l'animale ainsi que les résultats obtenus par RMN spectrométrie ont conforté l'idée d'un renforcement des contrôles descendants de la douleur par le paracétamol. Ceci met en lumière, au niveau de la vl-SGPA, la mise en jeu d'une cascade de signalisation impliquant les acteurs suivants : **TRPV1, mGLUR5, PLC, DAGL et CB1**.

Concernant cette cascade, nos études de pharmacologies comportementales chez l'animal présentent des limites quant aux possibilités d'explorer plus finement ces voies de signalisations et notamment les liens existants entre ces différents acteurs. Elles ne permettent que difficilement de savoir si un acteur est en amont ou en aval par rapport à un autre dans l'action d'un antalgique administré par voie systémique. Une manière de répondre à cette problématique serait l'étude de cette cascade par par technique de « *patch clamp* » sur tranche de vl-SGPA :

*Cette technique permet de mesurer les courants **inhibiteurs post-synaptiques**, Inhibitory Post Synaptic Current (IPSC) ou **excitateurs post-synaptiques**, Excitatory Post Synaptic Current (EPSC) induits respectivement par une **libération de GABA** ou **de glutamate**. Nous pourrions étudier la modification de ces courants après une administration, dans le milieu d'incubation, de *p*-aminophénol. Nous émettons l'hypothèse que celui-ci est métabolisé par l'enzyme FAAH exprimée par la SGPA en AM₄₀₄ qui, en conséquence, activerait le récepteur TRPV₁ pour induire une augmentation de la fréquence des EPSC comme retrouvée après administration de capsaïcine (1 µM) (Kawahara et al., 2011). Grâce à cette technique, nous pourrions savoir si cette éventuelle activation du TRPV₁ est post- ou pré-synaptique. L'implication de la FAAH et du récepteur TRPV₁ pourront être confirmés en vérifiant si la possible augmentation de la fréquence des EPSC induites par le *p*-aminophénol est abolie par une co-administration de *p*-aminophénol avec un inhibiteur de la FAAH ou un antagoniste du récepteur TRPV₁. Le même travail pourra être réalisé avec une administration d'AM₄₀₄. De la même manière, la mesure des courants inhibiteurs pourra nous renseigner quant à l'implication de ce neurotransmetteur ainsi que la contribution du récepteur CB₁ pré- et post-synaptiques sur l'action du *p*-aminophénol ou d'AM₄₀₄.*

Concernant le rôle central du récepteur CB1, nous avons émis l'hypothèse que le paracétamol produirait, *via* la cascade **TRPV1-mGLUR5-PLC-DAGL**, une augmentation des taux de 2-AG dans la SGPA ce qui conduirait à l'activation des récepteurs CB1. Ce mécanisme pourrait expliquer le rôle indirect du récepteur CB1 dans l'action antalgique du paracétamol. En effet, l'AM404 n'a que très peu d'affinité pour ce récepteur (Zygmunt et al., 2000). Pourtant, une inhibition du récepteur CB1 bloque l'effet antalgique du paracétamol (Mallet et al., 2008). **Il serait donc intéressant d'étudier l'impact d'une administration de paracétamol sur les variations des taux d'endocannabinoïde dans la vl-SGPA.**

Les travaux de Barrière et al. (2013) avaient préalablement montré qu'une administration du métabolite intermédiaire du paracétamol, le p-aminophénol, **ne produisait aucune variation des taux en 2-AG et AEA sur le cerveau total**. Cependant, il faut noter que, s'il y avait une variation locale des taux en endocannabinoïdes, il se pourrait que cette variation soit **noyée par le signal global obtenu dans le cerveau total**. Une autre étude a mis en évidence qu'une administration systémique d'AM404 induisait une augmentation des taux de 2-AG dans un autre noyau cérébral, après une stimulation ionique grâce à une technique de microdialyse (Wiskerke et al., 2012). Nous proposons donc de répondre à cette problématique par :

*Une étude des répercussions d'une administration de paracétamol sur des taux en endocannabinoïdes dans la vl-SGPA par la technique de microdialyse chez l'animal vigile. La méthode suivie pour cette expérimentation est détaillée dans la partie **Données complémentaires.II.1.2. Microdialyse cérébrale et spinale**. Il faut noter que les propriétés lipophiles de ces endocannabinoïdes complexifient les études de microdialyse et requièrent une méthode particulière. Il est en effet possible d'optimiser le rendement d'extraction des endocannabinoïdes en supplémentant la solution de perfusion de RINGER avec 30% de hydroxypropyl- β -cyclodextrin (Buczynski et Parsons, 2010; Wiskerke et al., 2012; Ceccarini et al., 2013). Ainsi, nous pourrions évaluer, après administration de paracétamol chez le rat vigile (300 mg/kg, p.o.), les variations des taux de 2-AG et d'anandamide au cours du temps. Il serait également possible, sur ces mêmes recueils, d'obtenir la courbe d'apparition du p-aminophénol et de l'AM₄₀₄ au sein de la vl-SGPA, afin de faire la corrélation entre une possible variation en endocannabinoïde et l'apparition de l'AM₄₀₄.*

2. Etude du système sérotoninergiques descendant : substrat au paracétamol pour son action antalgique

Plusieurs arguments plaident en faveur d'une libération spinale de sérotonine après traitement au paracétamol, suite au recrutement des voies bulbo-spinales monoaminergiques

descendantes. Ce système sérotoninergique de contrôle de la douleur prend naissance au niveau du tronc cérébral (SGPA et RVM) et projette des fibres nerveuses contenant de la sérotonine jusqu'à la moelle épinière. À ce niveau, la sérotonine libérée va inhiber la transmission du message douloureux. Notre équipe et d'autres ont démontré chez l'animal (Mallet et al., 2010) et chez l'Homme (Pickering et al., 2006, 2008) l'implication de ce système sérotoninergique descendant dans l'action antinociceptive du paracétamol.

Cependant, les arguments plaidant en faveur d'un renforcement de ces contrôles descendants sérotoninergiques sont **indirects** puisque la preuve de ce concept a été mise en évidence par une perte d'efficacité du paracétamol après l'administration d'**antagonistes sérotoninergiques au niveau médullaire** (Pelissier et al., 1995, 1996; Alloui et al., 1996, 2002; Bardin et al., 1997, 2000; Courade et al., 2001b; Bonnefont et al., 2003a, 2005, 2007; Libert et al., 2004; Dogrul et al., 2012b; Liu et al., 2013) ou de **lésion ou déplétion des voies descendantes sérotoninergique** (Tjølsen et al., 1991; Pini et al., 1996; Miranda et al., 2003; Dogrul et al., 2012a). De plus, une étude de Courade et al. (2001) ne retrouve pas d'augmentation des taux de 5-HT médullaire après une administration de paracétamol.

Une étude par microdialyse spinale de l'équipe de Jung et al. (1994) observe que la morphine administrée par la voie i.c.v. à une dose antalgique est responsable d'une augmentation médullaire de la 5-HT. Plus précisément, il a été montré que l'administration de morphine dans la SGPA pouvait produire un effet antinociceptif corrélé à une augmentation médullaire de 5-HT pouvant être bloquée par la naloxone (**Figure 63**, Yaksh and Tyce, 1979). Il a également été démontré qu'une stimulation électrique de la SGPA engendre la production et la libération médullaire de la 5-HT (Kato et al., 1996; Cui et al., 1999).

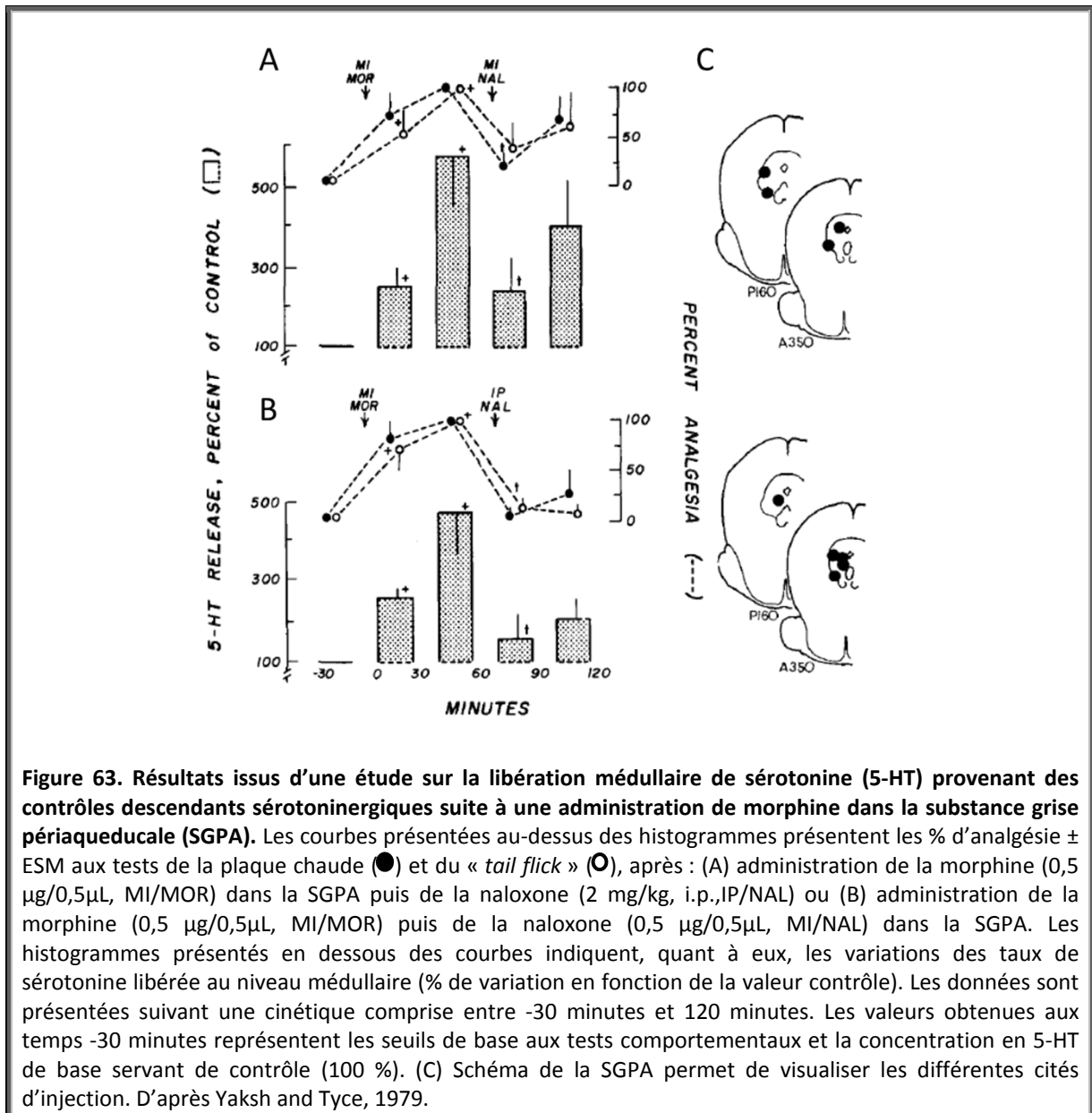


Figure 63. Résultats issus d'une étude sur la libération médullaire de sérotonine (5-HT) provenant des contrôles descendants sérotoninergiques suite à une administration de morphine dans la substance grise périaqueducule (SGPA). Les courbes présentées au-dessus des histogrammes présentent les % d'analgésie \pm ESM aux tests de la plaque chaude (●) et du « tail flick » (○), après : (A) administration de la morphine (0,5 μ g/0,5 μ L, MI/MOR) dans la SGPA puis de la naloxone (2 mg/kg, i.p., IP/NAL) ou (B) administration de la morphine (0,5 μ g/0,5 μ L, MI/MOR) puis de la naloxone (0,5 μ g/0,5 μ L, MI/NAL) dans la SGPA. Les histogrammes présentés en dessous des courbes indiquent, quant à eux, les variations des taux de sérotonine libérée au niveau médullaire (% de variation en fonction de la valeur contrôle). Les données sont présentées suivant une cinétique comprise entre -30 minutes et 120 minutes. Les valeurs obtenues aux temps -30 minutes représentent les seuils de base aux tests comportementaux et la concentration en 5-HT de base servant de contrôle (100 %). (C) Schéma de la SGPA permet de visualiser les différents cités d'injection. D'après Yaksh and Tyce, 1979.

Concernant le paracétamol, à ce jour, **aucune étude n'a clairement démontré une augmentation des taux de sérotonine spinale**. Ainsi, nous projetons de :

Déterminer l'impact du paracétamol sur les taux de sérotonine extracellulaire des couches I et II de la corne dorsale de la moelle épinière d'animaux souffrant de douleur chronique (modèle de monoarthrite induit par injection intra-articulaire d'ACF). Nous utiliserons alors la technique de microdialyse spinale chez l'animal vigile, récemment mise au point dans l'équipe, pour comparer les effets sur le taux de 5-HT médullaire chez des animaux recevant un traitement au paracétamol ou le véhicule.

Nous avons d'ores et déjà entamé une exploration des variations des taux de 5-HT après administration de paracétamol par microdialyse spinale (**Figure 59**). Les résultats préliminaires nous montrent l'effet escompté, à savoir une augmentation des taux de la 5-HT après administration de paracétamol. Cependant, cette étude en cours est pour le moment incomplète. Mais, nous notons malgré tout une tendance nette à l'augmentation, qui nécessite d'être confirmée.

Lors de la mise au point de la technique de microdialyse, nous avons pu quantifier au niveau de la vl-SGPA **des variations des taux de 5-HIAA** (métabolite de la 5-HT) extracellulaire après administration de paracétamol (300 mg/kg, *p.o.*, **Figure 58B**), phénomène non retrouvé chez les animaux recevant le traitement véhicule. Une tendance similaire est observée avec la 5-HT mais les faibles taux recueillis sont en dessous des seuils de quantification, limitant ainsi les possibilités d'interprétation de ces données. Ces résultats suggèrent cependant une augmentation de l'activité du système sérotoninergique au niveau de la vl-SGPA faisant suite à l'administration de paracétamol.

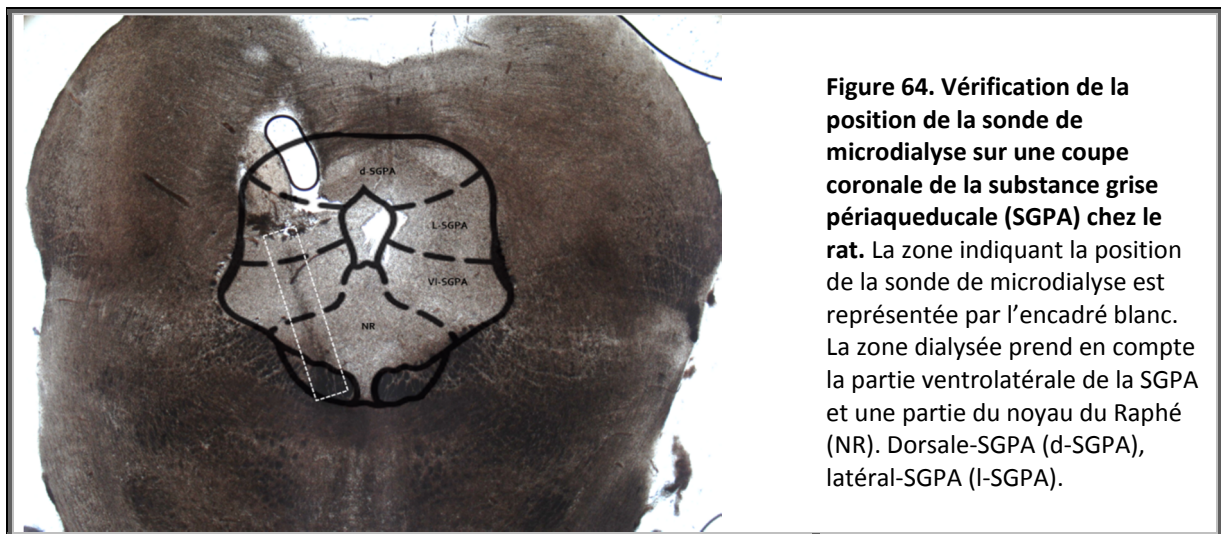
Des effets similaires observés dans la littérature indiquent que l'administration de paracétamol produit une augmentation de la 5-HT au niveau du tronc cérébral (Pini et al., 1996). Toutefois le rôle de cette augmentation de la 5-HT au niveau de la SGPA dans la douleur n'est pas très bien caractérisé. Quelques articles relatent qu'une administration de 5-HT dans la SGPA pourrait produire des effets antinociceptifs (Bartsch et al., 2004; Baptista et al., 2012; Jeong et al., 2013). Plus précisément, les travaux de Barsch et al. (2004) ont montré qu'une administration de naratriptan (agoniste 5-HT_{1B/1D}, utilisé comme antimigraineux) dans la vl-SGPA pouvait spécifiquement diminuer une douleur d'origine intracrânienne, en recrutant les contrôles descendants sérotoninergiques. L'équipe de Jeong et al. (2008, 2013), détaille des effets modulateurs de la 5-HT au niveau de la SGPA, grâce à la technique d'électrophysiologie sur tranche. En effet, l'administration de la 5-HT ou d'un inhibiteur spécifique de la recapture de la 5-HT (fluoxétine) réduirait les courants GABAergiques au niveau de la SGPA. La localisation post-synaptique des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{2A/C} et pré-synaptique des récepteurs 5-HT_{1A/B/D} et 5-HT_{2A/C} permettrait de réguler l'activité de la SGPA par la

régulation du tonus inhibiteur GABAergique (Kishimoto et al., 2001; Jeong et al., 2008, 2013). Cependant, le mécanisme d'action n'est pas parfaitement défini et semble plus complexe qu'une désinhibition du tonus GABAergiques.

Dans notre cas, aucune donnée ne permet de comprendre l'origine de cette augmentation de la 5-HT dans la SGPA ni son rôle dans la modulation de la douleur en relation avec le paracétamol. Nous pouvons cependant émettre certaines hypothèses quant à l'origine de ces taux de 5-HT :

- La vl-SGPA est une structure assez proche du noyau du Raphé, qui est une source de 5-HT. Il est probable qu'une libération à ce niveau de 5-HT puisse être capté par diffusion jusqu'à la sonde de microdialyse placée dans la vl-SGPA (**Figure 64**).
- LA SGPA reçoit des afférences sérotoninergiques en provenance de la RVM, et plus particulièrement de la partie dorsale du noyau du Raphé (Beitz et al., 1986). L'administration de kainate dans cette structure induit effectivement la libération de 5-HT au niveau de la SGPA (Viana et al., 1997).
- Les travaux de Maione (1998b) indiquent une augmentation de la 5-HT au niveau de la SGPA qui dépend des récepteurs au glutamate de la famille des mGLURII et mGLURIII. Ceci peut être cohérent avec l'augmentation de glutamate observé dans la SGPA après administration de paracétamol.

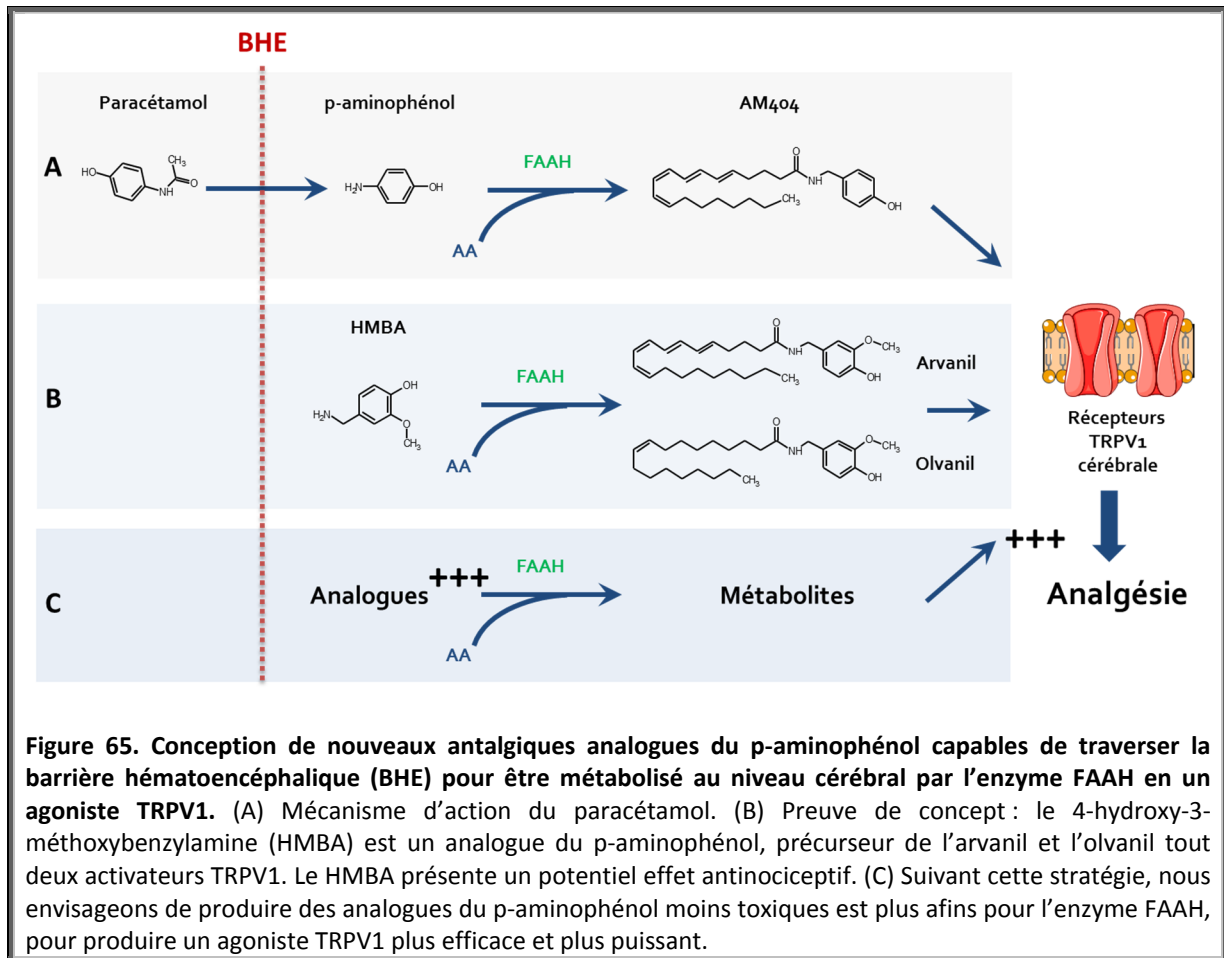
Les études concernant le mécanisme antalgique du paracétamol démontrent donc l'implication de nombreuses cibles pharmacologiques. Cependant le rôle de la 5-HT cérébrale et plus particulièrement dans la vl-SGPA n'a pas été étudié. Il serait donc intéressant d'aborder un éventuel rôle des récepteurs à la 5-HT au niveau de la vl-SGPA.



II. Concept de vectorisation : optimisation de nouveaux précurseurs antalgiques ciblant la substance grise périaqueducale

L'ensemble des travaux de cette thèse ont permis de mettre en avant une séquence mécanistique du paracétamol au niveau de la SGPA, positionnant le récepteur TRPV1 comme une cible privilégiée dans son action antalgique (**Figure 65A**). Le paracétamol serait donc une molécule dépourvue d'effet propre, mais qui serait le substrat d'une enzyme (FAAH) catalysant la synthèse du métabolite actif AM404 ciblant le récepteur TRPV1. Ceci conduit à la notion de thérapie vectorisée, où seules les régions pourvues d'activités FAAH et exprimant le récepteur TRPV1, telle que la SGPA, peuvent être une cible active du paracétamol. Cependant, l'efficacité du paracétamol se limite à des douleurs légères à modérer, son utilisation est alors restreinte aux maux du quotidien et sans grande utilité pour le traitement des douleurs plus intenses. Il faut également noter que lors de surdosage, le paracétamol est responsable d'effets indésirables dûs à la formation de NAPQI.

Le modèle mécanistique du paracétamol proposé est séduisant et offre un potentiel thérapeutique prometteur, faisant intervenir corrélativement le système endovanilloïde et endocannabinoïde. L'objectif serait donc de développer de nouveaux antalgiques qui, à l'image du paracétamol, seraient plus efficaces avec des effets indésirables moindres. Ainsi, il serait intéressant de proposer des produits substrats de l'enzyme FAAH, capable d'être métabolisé au niveau cérébral en un agoniste de type N-acylamine, plus robuste et spécifique que l'AM404 vis-à-vis du récepteur TRPV1.

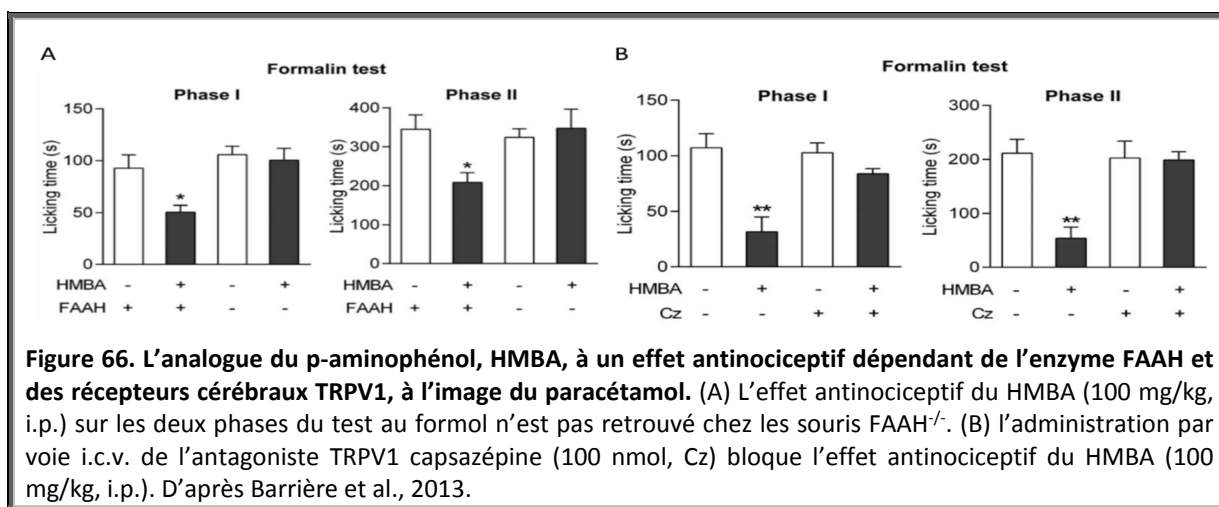


Suivant cette stratégie, les travaux de Barrière et al. (2013) ont proposé d'explorer le potentiel analgésique d'un analogue du p-aminophénol, le 4-hydroxy-3-méthoxybenzylamine (HMBA). Ce dernier est responsable de la production des dérivés lipidiques, Arvanil et Olvanil, à même de pouvoir activer le récepteur TRPV1 (Figure 65B). Plus particulièrement, l'Arvanil aurait des propriétés proches de l'AM404 avec une structure hybride entre un agoniste des récepteurs TRPV1 et un inhibiteur du transporteur de l'anandamide, AMT (Di Marzo et al., 2002). Son intérêt réside aussi dans le fait que le HMBA ne génère pas de substance réactive comme le NAPQI, responsable des effets néphro- et hépatotoxiques du paracétamol à trop forte dose. Les premières études portant sur le potentiel antinociceptif du HMBA prouvent son efficacité avec une action analgésique dépendant de l'enzyme FAAH (Figure 66A) et des récepteurs TRPV1 centraux (Figure 66B).

Nous souhaitons, en collaboration avec l'école de chimie de Clermont-Ferrand, designer de nouveaux analogues du p-aminophénol répondant au critère suivant (**Figure 65C**) :

- La synthèse d'un bioprécurseur, substrat de l'enzyme FAAH, avec une affinité plus accrue pour cette dernière.
- La formation d'un métabolite capable d'avoir une meilleure affinité et une meilleure spécificité pour le récepteur TRPV1
- Les bioprécurseurs et métabolites formés ne devront pas être à l'origine de la formation d'autres espèces réactives, comme le NAPQI, responsable d'effets indésirables.

Ainsi, le but de ces travaux consiste non seulement à d'étudier le modèle mécanistique du paracétamol, mais aussi d'apporter une réelle innovation thérapeutique dans le traitement de la douleur. En effet, nous pourrions synthétiser, à l'image du paracétamol, des bioprécurseurs aux effets indésirables moindres capables d'être métabolisé au niveau cérébral par l'enzyme FAAH, en un puissant agoniste des récepteurs TRPV1 capable de renforcer les contrôles endogènes de la douleur et de diminuer les symptômes douloureux quelque en soit l'origine.



RÉFÉRENCES

A

- Abelson, K.S.P., Kommalage, M., and Höglund, A.U. (2004). Spinal cholinergic involvement after treatment with aspirin and paracetamol in rats. *Neurosci. Lett.* *368*: 116–120.
- Adnet, F., Atout, S., Galinski, M., and Lapostolle, F. (2005). Évolution des intoxications médicamenteuses volontaires en France. *Réanimation* *14*: 721–726.
- Agarwal, N., Pacher, P., Tegeder, I., Amaya, F., Constantin, C.E., Brenner, G.J., et al. (2007). Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nat. Neurosci.* *10*: 870–879.
- Aimone, L.D., and Gebhart, G.F. (1986). Stimulation-produced spinal inhibition from the midbrain in the rat is mediated by an excitatory amino acid neurotransmitter in the medial medulla. *J. Neurosci.* *6*: 1803–1813.
- Akiba, Y., Guth, P.H., Engel, E., Nastaskin, I., and Kaunitz, J.D. (1999). Acid-sensing pathways of rat duodenum. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* *277*: G268–G274.
- Akil, H., and Mayer, D.J. (1972). Antagonism of stimulation-produced analgesia by p-CPA, a serotonin synthesis inhibitor. *Brain Res.* *44*: 692–697.
- Alloui, A., Chassaing, C., Schmidt, J., Ardid, D., Dubray, C., Cloarec, A., et al. (2002). Paracetamol exerts a spinal, tropisetron-reversible, antinociceptive effect in an inflammatory pain model in rats. *Eur. J. Pharmacol.* *443*: 71–77.
- Alloui, A., Pelissier, T., Dubray, C., Lavarenne, J., and Eschalié, A. (1996). Tropisetron inhibits the antinociceptive effect of intrathecally administered paracetamol and serotonin. *Fundam. Clin. Pharmacol.* *10*: 406–407.
- Altman, R.D., Zinsenheim, J.R., Temple, A.R., and Schweinle, J.E. (2007). Three-month efficacy and safety of acetaminophen extended-release for osteoarthritis pain of the hip or knee: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Osteoarthritis Cartilage* *15*: 454–461.
- Amar, P.J., and Schiff, E.R. (2007). Acetaminophen safety and hepatotoxicity--where do we go from here? *Expert Opin. Drug Saf.* *6*: 341–355.
- Ameri, A. (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Prog. Neurobiol.* *58*: 315–348.
- American College of Gastroenterology Task Force on Irritable Bowel Syndrome, Brandt, L.J., Chey, W.D., Foxx-Orenstein, A.E., Schiller, L.R., Schoenfeld, P.S., et al. (2009). An evidence-based position statement on the management of irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* *104 Suppl 1*: S1–35.
- Anderson, B.J. (2008). Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action. *Pediatr. Anesth.* *18*: 915–921.
- Andersson, D.A., Gentry, C., Alenmyr, L., Killander, D., Lewis, S.E., Andersson, A., et al. (2011). TRPA1 mediates spinal antinociception induced by acetaminophen and the cannabinoid Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Nat Commun* *2*: 551.
- Andrade, E.L., Meotti, F.C., and Calixto, J.B. (2012). TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. *Pharmacol. Ther.* *133*: 189–204.
- Andreasson, K.I., Savonenko, A., Vidensky, S., Goellner, J.J., Zhang, Y., Shaffer, A., et al. (2001). Age-Dependent Cognitive Deficits and Neuronal Apoptosis in Cyclooxygenase-2 Transgenic Mice. *J. Neurosci.* *21*: 8198–8209.
- Apkarian, A.V., Bushnell, M.C., Treede, R.D., and Zubieta, J.K. (2005). Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain* *9*: 463–84.
- Aronoff, D.M., Oates, J.A., and Boutaud, O. (2006). New insights into the mechanism of action of acetaminophen: Its clinical pharmacologic characteristics reflect its inhibition of the two prostaglandin H2 synthases*. *Clin. Pharmacol. Ther.* *79*: 9–19.
- Arun, O., Canbay, O., Celebi, N., Sahin, A., Konan, A., Atilla, P., et al. (2013). The analgesic efficacy of intra-articular acetaminophen in an experimental model of carrageenan-induced arthritis. *Pain Res. Manag. J.*

Can. Pain Soc. J. Société Can. Pour Trait. Douleur 18: e63–67.

Ayoub, S., Botting, R., Goorha, S., Colville-Nash, P., Willoughby, D., and Ballou, L. (2004). Acetaminophen-induced hypothermia in mice is mediated by a prostaglandin endoperoxide synthase 1 gene-derived protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 11165–9.

Ayoub, S.S., Colville-Nash, P.R., Willoughby, D.A., and Botting, R.M. (2006). The involvement of a cyclooxygenase 1 gene-derived protein in the antinociceptive action of paracetamol in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 538: 57–65.

Ayoub, S.S., Pryce, G., Seed, M.P., Bolton, C., Flower, R.J., and Baker, D. (2011). Paracetamol-Induced Hypothermia Is Independent of Cannabinoids and Transient Receptor Potential Vanilloid-1 and Is Not Mediated by AM404. *Drug Metab. Dispos.* 39: 1689–1695.

Azad, S.C., Monory, K., Marsicano, G., Cravatt, B.F., Lutz, B., Zieglgänsberger, W., et al. (2004). Circuitry for Associative Plasticity in the Amygdala Involves Endocannabinoid Signaling. *J. Neurosci.* 24: 9953–9961.

Azhdari Zarmehri, H., Semnani, S., Fathollahi, Y., Erami, E., Khakpay, R., Azizi, H., et al. (2011). Intra-periaqueductal gray matter microinjection of orexin-A decreases formalin-induced nociceptive behaviors in adult male rats. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* 12: 280–287.

B

Bai, F., Yin, T., Johnstone, E.M., Su, C., Varga, G., Little, S.P., et al. (2004). Molecular cloning and pharmacological characterization of the guinea pig 5-HT_{1E} receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 484: 127–139.

Bandler, R., and Carrive, P. (1988). Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal gray region of the unrestrained cat. *Brain Res.* 439: 95–106.

Bandler, R., Carrive, P., and Zhang, S.P. (1991). Integration of somatic and autonomic reactions within the midbrain periaqueductal grey: viscerotopic, somatotopic and functional organization. *Prog. Brain Res.* 87: 269–305.

Bandler, R., and Shipley, M.T. (1994). Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends Neurosci.* 17: 379–389.

Bandschapp, O., Filitz, J., Urwyler, A., Koppert, W., and Ruppen, W. (2011). Tropisetron blocks analgesic action of acetaminophen: A human pain model study. *PAIN* 152: 1304–1310.

Banner, K.H., Igney, F., and Poll, C. (2011). TRP channels: Emerging targets for respiratory disease. *Pharmacol. Ther.* 130: 371–384.

Bannwarth, B., Netter, P., Lopicque, F., Gillet, P., Péré, P., Boccard, E., et al. (1992). Plasma and cerebrospinal fluid concentrations of paracetamol after a single intravenous dose of propacetamol. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 34: 79–81.

Baptista, D., Nunes-de-Souza, R.L., and Canto-de-Souza, A. (2012). Activation of 5-HT_{2C} receptors in the dorsal periaqueductal gray increases antinociception in mice exposed to the elevated plus-maze. *Behav. Brain Res.* 235: 42–47.

Barbara, G., Alloui, A., Nargeot, J., Lory, P., Eschalier, A., Bourinet, E., et al. (2009). T-type calcium channel inhibition underlies the analgesic effects of the endogenous lipoamino acids. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29: 13106–13114.

Bardin, L., Bardin, M., Lavarenne, J., and Eschalier, A. (1997). Effect of intrathecal serotonin on nociception in rats: influence of the pain test used. *Exp. Brain Res.* 113: 81–87.

Bardin, L., Lavarenne, J., and Eschalier, A. (2000a). Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. *Pain* 86: 11–18.

Bardin, L., Schmidt, J., Alloui, A., and Eschalier, A. (2000b). Effect of intrathecal administration of serotonin in chronic pain models in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 409: 37–43.

- Barrière, D.A., Mallet, C., Blomgren, A., Simonsen, C., Daulhac, L., Libert, F., et al. (2013a). Fatty Acid Amide Hydrolase-Dependent Generation of Antinociceptive Drug Metabolites Acting on TRPV1 in the Brain. *PLoS ONE* 8: e70690.
- Barrière, D.A., Mallet, C., Blomgren, A., Simonsen, C., Daulhac, L., Libert, F., et al. (2013b). Fatty acid amide hydrolase-dependent generation of antinociceptive drug metabolites acting on TRPV1 in the brain. *PLoS One* 8: e70690.
- Bars, D.L., Gozariu, M., and Cadden, S.W. (2001). Animal Models of Nociception. *Pharmacol. Rev.* 53: 597–652.
- Barton, M., Eberle, E., and Shannon, H. (2005). The antihyperalgesic effects of the T-type calcium channel blockers ethosuximide, trimethadione, and mibefradil. *Eur. J. Pharmacol. European journal of pharmacology*: 79–85.
- Bartsch, T., Knight, Y.E., and Goadsby, P.J. (2004). Activation of 5-HT(1B/1D) receptor in the periaqueductal gray inhibits nociception. *Ann. Neurol.* 56: 371–381.
- Basbaum, A.I., and Fields, H.L. (1984). Endogenous Pain Control Systems: Brainstem Spinal Pathways and Endorphin Circuitry. *Annu. Rev. Neurosci.* 7: 309–338.
- Bateman, D.N. (2009). Limiting paracetamol pack size: has it worked in the UK? *Clin. Toxicol. Phila. Pa* 47: 536–541.
- Bateman, D.N. (2014). Pack size and paracetamol overdose: 16 years later. *Clin. Toxicol. Phila. Pa* 52: 821–823.
- Becerra, L., Breiter, H.C., Wise, R., Gonzalez, R.G., and Borsook, D. (2001). Reward circuitry activation by noxious thermal stimuli. *Neuron* 32: 927–946.
- Becerra, L., Harter, K., Gonzalez, R.G., and Borsook, D. (2006). Functional magnetic resonance imaging measures of the effects of morphine on central nervous system circuitry in opioid-naïve healthy volunteers. *Anesth. Analg.* 103: 208–216, table of contents.
- Becker, K.G., and Schultz, S.T. (2010). Similarities in features of autism and asthma and a possible link to acetaminophen use. *Med. Hypotheses* 74: 7–11.
- Behbehani, M.M., and Fields, H.L. (1979). Evidence that an excitatory connection between the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus mediates stimulation produced analgesia. *Brain Res.* 170: 85–93.
- Behbehani, M.M., Jiang, M.R., Chandler, S.D., and Ennis, M. (1990). The effect of GABA and its antagonists on midbrain periaqueductal gray neurons in the rat. *Pain* 40: 195–204.
- Behbehani, M.M., and Pert, A. (1984). A mechanism for the analgesic effect of neurotensin as revealed by behavioral and electrophysiological techniques. *Brain Res.* 324: 35–42.
- Beltramo, M., Fonseca, F.R. de, Navarro, M., Calignano, A., Gorriti, M.A., Grammatikopoulos, G., et al. (2000). Reversal of dopamine D(2) receptor responses by an anandamide transport inhibitor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20: 3401–3407.
- Beltramo, M., and Piomelli, D. (2000). Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonylglycerol. [Miscellaneous Article]. *Neuroreport* April 27 2000 11: 1231–1235.
- Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S.Y., Makriyannis, A., and Piomelli, D. (1997). Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 277: 1094–1097.
- Benarroch, E.E. (2008). Descending monoaminergic pain modulation: bidirectional control and clinical relevance. *Neurology* 71: 217–221.
- Berge, O.-G., Hole, K., and Ögren, S.-O. (1983). Attenuation of morphine-induced analgesia by p-chlorophenylalanine and p-chloroamphetamine: Test-dependent effects and evidence for brainstem 5-hydroxytryptamine involvement. *Brain Res.* 271: 51–64.
- Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1: 11–21.

- Bertolini, A., Ferrari, A., Ottani, A., Guerzoni, S., Tacchi, R., and Leone, S. (2006). Paracetamol: new vistas of an old drug. *CNS Drug Rev.* 12: 250–275.
- Birder, L.A., Kanai, A.J., Groat, W.C. de, Kiss, S., Nealen, M.L., Burke, N.E., et al. (2001). Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 13396–13401.
- Bisogno, T., Maccarrone, M., Petrocellis, L. De, Jarrahian, A., Finazzi-Agrò, A., Hillard, C., et al. (2001). The uptake by cells of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous agonist of cannabinoid receptors: Membrane transporter(s) for endocannabinoids. *Eur. J. Biochem.* 268: 1982–1989.
- Bittar, R.G., Kar-Purkayastha, I., Owen, S.L., Bear, R.E., Green, A., Wang, S., et al. (2005). Deep brain stimulation for pain relief: a meta-analysis. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* 12: 515–519.
- Bodnar, R.J. (2013). Endogenous opiates and behavior: 2012. *Peptides* 50: 55–95.
- Bodnar, R.J., Kirchgessner, A., Nilaver, G., Mulhern, J., and Zimmerman, E.A. (1982). Intraventricular capsaicin: Alterations in analgesic responsivity without depletion of substance P. *Neuroscience* 7: 631–638.
- Bonnefont, J., Alloui, A.P.D., Chapuy, E., Clottes, E.P.D., and Eschalier, A.P.D. (2003a). Orally Administered Paracetamol Does Not Act Locally in the Rat Formalin Test: Evidence for a Supraspinal, Serotonin-dependent Antinociceptive Mechanism. [Miscellaneous Article]. *Anesthesiol.* Oct. 2003 99: 976–981.
- Bonnefont, J., Chapuy, E., Clottes, E., Alloui, A., and Eschalier, A. (2005). Spinal 5-HT_{1A} receptors differentially influence nociceptive processing according to the nature of the noxious stimulus in rats: effect of WAY-100635 on the antinociceptive activities of paracetamol, venlafaxine and 5-HT. *Pain* 114: 482–490.
- Bonnefont, J., Courade, J.-P., Alloui, A., and Eschalier, A. (2003b). [Antinociceptive mechanism of action of paracetamol]. *Drugs* 63 Spec No 2: 1–4.
- Bonnefont, J., Daulhac, L., Etienne, M., Chapuy, E., Mallet, C., Ouchchane, L., et al. (2007). Acetaminophen recruits spinal p42/p44 MAPKs and GH/IGF-1 receptors to produce analgesia via the serotonergic system. *Mol. Pharmacol.* 71: 407–415.
- Booker, L., Kinsey, S.G., Abdullah, R.A., Blankman, J.L., Long, J.Z., Ezzili, C., et al. (2012). The fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitor PF-3845 acts in the nervous system to reverse LPS-induced tactile allodynia in mice. *Br. J. Pharmacol.* 165: 2485–2496.
- Borsook, D., and Becerra, L. (2011). CNS animal fMRI in pain and analgesia. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35: 1125–1143.
- Borsook, D., and Becerra, L. CNS animal fMRI in pain and analgesia. *Neurosci Biobehav Rev* 35: 1125–43.
- Bortolato, M., Campolongo, P., Mangieri, R.A., Scattoni, M.L., Frau, R., Trezza, V., et al. (2006). Anxiolytic-Like Properties of the Anandamide Transport Inhibitor AM404. *Neuropsychopharmacology* 31: 2652–2659.
- Botting, R., and Ayoub, S. (2005). COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids:* 85–7.
- Botting, R.M. (2000). Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase 3? *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 31 Suppl 5: S202–210.
- Bouhassira, D. (2008). [Definition and classification of neuropathic pain]. *Presse Médicale Paris Fr.* 1983 37: 311–314.
- Bourinet, E., Alloui, A., Monteil, A., Barrère, C., Couette, B., Poirot, O., et al. (2005). Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *EMBO J.* 24: 315–324.
- Boutaud, O., Aronoff, D.M., Richardson, J.H., Marnett, L.J., and Oates, J.A. (2002). Determinants of the cellular specificity of acetaminophen as an inhibitor of prostaglandin H₂ synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 7130–7135.

- Braz, J.M., and Basbaum, A.I. (2008). Genetically expressed transneuronal tracer reveals direct and indirect serotonergic descending control circuits. *J. Comp. Neurol.* 507: 1990–2003.
- Breda, E.J. van, Worp, B. van der, Gemert, M. van, Meijer, R., Kappelle, J., Koudstaal, P.J., et al. (2002). PISA. The effect of paracetamol (acetaminophen) and ibuprofen on body temperature in acute stroke: protocol for a phase II double-blind randomised placebo-controlled trial [ISRCTN98608690]. *BMC Cardiovasc. Disord.* 2: 7.
- Breder, C.D., Dewitt, D., and Kraig, R.P. (1995). Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J. Comp. Neurol.* 355: 296–315.
- BRODIE, B.B., and AXELROD, J. (1948). The fate of acetanilide in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 94: 29–38.
- Brodie, T.G. (1900). The immediate action of an intravenous injection of blood-serum. *J. Physiol.* 26: 48–71.
- Buczynski, M.W., and Parsons, L.H. (2010). Quantification of brain endocannabinoid levels: methods, interpretations and pitfalls. *Br. J. Pharmacol.* 160: 423–442.
- Bunchorntavakul, C., and Reddy, K.R. (2013). Acetaminophen-related Hepatotoxicity. *Clin. Liver Dis.* 17: 587–607.
- Burgess, S.E., Gardell, L.R., Ossipov, M.H., Malan, T.P., Vanderah, T.W., Lai, J., et al. (2002). Time-dependent descending facilitation from the rostral ventromedial medulla maintains, but does not initiate, neuropathic pain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22: 5129–5136.
- Burkey, A.R., Carstens, E., Wenniger, J.J., Tang, J., and Jasmin, L. (1996). An opioidergic cortical antinociception triggering site in the agranular insular cortex of the rat that contributes to morphine antinociception. *J Neurosci* 16: 6612–23.
- Burtscher, M., Gatterer, H., Philippe, M., Krüsmann, P., Kernbeiss, S., Frontull, V., et al. (2013). Effects of a single low-dose acetaminophen on body temperature and running performance in the heat: a pilot project. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* 5: 190–193.
- Busquets-Garcia, A., Puighermanal, E., Pastor, A., Torre, R. de la, Maldonado, R., and Ozaita, A. (2011). Differential Role of Anandamide and 2-Arachidonoylglycerol in Memory and Anxiety-like Responses. *Biol. Psychiatry* 70: 479–486.
- ## C
- Cabral, G.A., Raborn, E.S., Griffin, L., Dennis, J., and Marciano-Cabral, F. (2008). CB2 receptors in the brain: role in central immune function. *Br. J. Pharmacol.* 153: 240–251.
- Cahill, K., and Ussher, M. (2007). Cannabinoid type 1 receptor antagonists (rimonabant) for smoking cessation. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD005353.
- Cahn, A., and Hepp, P. (1886). Das Antifebrin, ein neues Fiebermittel. *Cent. Klein Med* 7: 561–564.
- Calignano, A., Rana, G.L., Giuffrida, A., and Piomelli, D. (1998). Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* 394: 277–281.
- Calvino, B. (2009). Paracétamol : ne pas dépasser la dose prescrite. Pourlascience.fr.
- Campbell, F.A., Tramèr, M.R., Carroll, D., Reynolds, D.J., Moore, R.A., and McQuay, H.J. (2001). Are cannabinoids an effective and safe treatment option in the management of pain? A qualitative systematic review. *BMJ* 323: 13–16.
- Carlson, J.D., Maire, J.J., Martenson, M.E., and Heinricher, M.M. (2007). Sensitization of pain-modulating neurons in the rostral ventromedial medulla after peripheral nerve injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27: 13222–13231.
- Casarotto, P.C., Terzian, A.L.B., Aguiar, D.C., Zangrossi, H., Guimar[[atilde]]es, F.S., Wotjak, C.T., et al. (2011). Opposing Roles for Cannabinoid Receptor Type-1 (CB1) and Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 Channel (TRPV1) on the Modulation of Panic-Like Responses in Rats. *Neuropsychopharmacology* 37: 478–486.
- Caterina, M. (2003). Vanilloid receptors take a TRP beyond the sensory afferent. *Pain* 105: 5–9.

- Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K.R., et al. (2000). Impaired Nociception and Pain Sensation in Mice Lacking the Capsaicin Receptor. *Science* 288: 306–313.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., and Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816–824.
- Cavanaugh, D.J., Chesler, A.T., Jackson, A.C., Sigal, Y.M., Yamanaka, H., Grant, R., et al. (2011). Trpv1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31: 5067–5077.
- Cavanaugh, D.J., Chesler, A.T., Jackson, A.C., Sigal, Y.M., Yamanaka, H., Grant, R., et al. Trpv1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells. *J Neurosci* 31: 5067–77.
- Ceccarini, J., Casteels, C., Koole, M., Bormans, G., and Laere, K.V. (2013). Transient changes in the endocannabinoid system after acute and chronic ethanol exposure and abstinence in the rat: a combined PET and microdialysis study. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 40: 1582–1594.
- Chandrasekharan, N.V., Dai, H., Roos, K.L.T., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S., et al. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 13926–13931.
- Chang, L., Luo, L., Palmer, J.A., Sutton, S., Wilson, S.J., Barbier, A.J., et al. (2006). Inhibition of fatty acid amide hydrolase produces analgesia by multiple mechanisms. *Br. J. Pharmacol.* 148: 102–113.
- Chapman, V. (1999). The cannabinoid CB1 receptor antagonist, SR141716A, selectively facilitates nociceptive responses of dorsal horn neurones in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 127: 1765–1767.
- Cheng, Z.-F., Fields, H.L., and Heinricher, M.M. (1986). Morphine microinjected into the periaqueductal gray has differential effects on 3 classes of medullary neurons. *Brain Res.* 375: 57–65.
- Chen, S.-R.M.D., and Pan, H.-L.M.D. (2001). Spinal Endogenous Acetylcholine Contributes to the Analgesic Effect of Systemic Morphine in Rats. *Anesthesiol.* August 2001 95: 525–530.
- Chen, T., Hui, R., Wang, X.-L., Zhang, T., Dong, Y.-X., and Li, Y.-Q. (2008). Origins of endomorphin-immunoreactive fibers and terminals in different columns of the periaqueductal gray in the rat. *J. Comp. Neurol.* 509: 72–87.
- Chen, Y.L., Li, A.H., Yeh, T.H., Chou, A.H., Weng, Y.S., and Wang, H.L. (2010). Nocistatin excites rostral agranular insular cortex-periaqueductal gray projection neurons by enhancing transient receptor potential cation conductance via G(alphaq/11)-PLC-protein kinase C pathway. *Neuroscience* 168: 226–239.
- Chin, C.-L., Tovcimak, A.E., Hradil, V.P., Seifert, T.R., Hollingsworth, P.R., Chandran, P., et al. (2008). Differential effects of cannabinoid receptor agonists on regional brain activity using pharmacological MRI. *Br. J. Pharmacol.* 153: 367–379.
- Chiou, L.-C., Hu, S.S.-J., and Ho, Y.-C. (2013). Targeting the cannabinoid system for pain relief? *Acta Anaesthesiol. Taiwan.* 51: 161–170.
- Chiou, L.-C., Lee, H.-J., Ho, Y.-C., Chen, S.-P., Liao, Y.-Y., Ma, C.-H., et al. (2010). Orexins/hypocretins: pain regulation and cellular actions. *Curr. Pharm. Des.* 16: 3089–3100.
- Chou, D., Abalos, E., Gyte, G.M., and Gülmezoglu, A.M. (2010). Paracetamol/acetaminophen (single administration) for perineal pain in the early postpartum period. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD008407.
- Chou, R., Qaseem, A., Snow, V., Casey, D., Cross, J.T., Shekelle, P., et al. (2007). Diagnosis and treatment of low back pain: a joint clinical practice guideline from the American College of Physicians and the American Pain Society. *Ann. Intern. Med.* 147: 478–491.
- Christo, P.J., and Mazloomdoost, D. (2008). Cancer pain and analgesia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1138: 278–298.
- Clapper, J.R., Moreno-Sanz, G., Russo, R., Guijarro, A., Vacondio, F., Duranti, A., et al. (2010).

- Anandamide suppresses pain initiation through a peripheral endocannabinoid mechanism. *Nat. Neurosci.* *13*: 1265–1270.
- Clissold, S.P. (1986). Paracetamol and phenacetin. *Drugs* *32 Suppl 4*: 46–59.
- Cohen, C., Perrault, G., Voltz, C., Steinberg, R., and Soubrié, P. (2002). SR141716, a central cannabinoid (CB1) receptor antagonist, blocks the motivational and dopamine-releasing effects of nicotine in rats. *Behav. Pharmacol.* *13*: 451–463.
- Cooper, Z.D., Comer, S.D., and Haney, M. (2013). Comparison of the analgesic effects of dronabinol and smoked marijuana in daily marijuana smokers. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *38*: 1984–1992.
- Costa, B., Bettoni, I., Petrosino, S., Comelli, F., Giagnoni, G., and Marzo, V. Di (2010). The dual fatty acid amide hydrolase/TRPV1 blocker, N-arachidonoyl-serotonin, relieves carrageenan-induced inflammation and hyperalgesia in mice. *Pharmacol. Res.* *61*: 537–546.
- Costa, B., Siniscalco, D., Trovato, A.E., Comelli, F., Sotgiu, M.L., Colleoni, M., et al. (2006). AM404, an inhibitor of anandamide uptake, prevents pain behaviour and modulates cytokine and apoptotic pathways in a rat model of neuropathic pain. *Br. J. Pharmacol.* *148*: 1022–1032.
- Courade, J.P., Caussade, F., Martin, K., Besse, D., Delchambre, C., Hanoun, N., et al. (2001). Effects of acetaminophen on monoaminergic systems in the rat central nervous system. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* *364*: 534–537.
- Cravatt, B.F., Demarest, K., Patricelli, M.P., Bracey, M.H., Giang, D.K., Martin, B.R., et al. (2001). Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*: 9371–9376.
- Cravatt, B.F., and Lichtman, A.H. (2004). The endogenous cannabinoid system and its role in nociceptive behavior. *J. Neurobiol.* *61*: 149–160.
- Cravatt, B.F., Saghatelian, A., Hawkins, E.G., Clement, A.B., Bracey, M.H., and Lichtman, A.H. (2004). Functional disassociation of the central and peripheral fatty acid amide signaling systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*: 10821–10826.
- Crawley, B., Saito, O., Malkmus, S., Fitzsimmons, B., Hua, X.-Y., and Yaksh, T. (2008). Acetaminophen prevents hyperalgesia in central pain cascade. *Neurosci. Lett. Neuroscience letters*: 50–3.
- Cristino, L., Petrocellis, L. de, Pryce, G., Baker, D., Guglielmotti, V., and Marzo, V. Di (2006). Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* *139*: 1405–1415.
- Cui, M., Feng, Y., McAdoo, D.J., and Willis, W.D. (1999). Periaqueductal Gray Stimulation-Induced Inhibition of Nociceptive Dorsal Horn Neurons in Rats Is Associated with the Release of Norepinephrine, Serotonin, and Amino Acids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *289*: 868–876.
- ## D
- Dalman, R., Daulhac, L., Antri, M., Eschalié, A., and Mallet, C. (2014). Supra-spinal FAAH is required for the analgesic action of paracetamol in an inflammatory context. *Neuropharmacology* *91C*: 63–70.
- Daly, D., Rong, W., Chess-Williams, R., Chapple, C., and Grundy, D. (2007). Bladder afferent sensitivity in wild-type and TRPV1 knockout mice. *J. Physiol.* *583*: 663–674.
- Dampney, R.A.L., Furlong, T.M., Horiuchi, J., and Iigaya, K. (2013). Role of dorsolateral periaqueductal grey in the coordinated regulation of cardiovascular and respiratory function. *Auton. Neurosci.* *175*: 17–25.
- Dani, M., Guindon, J., Lambert, C., and Beaulieu, P. (2007). The local antinociceptive effects of paracetamol in neuropathic pain are mediated by cannabinoid receptors. *Eur. J. Pharmacol.* *573*: 214–215.
- Dart, R.C., Erdman, A.R., Olson, K.R., Christianson, G., Manoguerra, A.S., Chyka, P.A., et al. (2006).

- Acetaminophen poisoning: an evidence-based consensus guideline for out-of-hospital management. *Clin. Toxicol. Phila. Pa* 44: 1–18.
- David Josephy, P. (2005). The molecular toxicology of acetaminophen. *Drug Metab. Rev.* 37: 581–594.
- Davies, N.M., Good, R.L., Roupe, K.A., and Yáñez, J.A. (2004). Cyclooxygenase-3: axiom, dogma, anomaly, enigma or splice error?--Not as easy as 1, 2, 3. *J. Pharm. Pharm. Sci. Publ. Can. Soc. Pharm. Sci. Société Can. Sci. Pharm.* 7: 217–226.
- Davis, J.B., Gray, J., Gunthorpe, M.J., Hatcher, J.P., Davey, P.T., Overend, P., et al. (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405: 183–187.
- Denes, E., Amaniou, M., Rogez, J.-P., Weinbreck, P., and Merle, L. (2002). [Acetaminophen-induced hypothermia, an AIDS related side-effect? About 4 cases]. *Ann. Médecine Interne* 153: 411–413.
- Depaulis, A., Keay, K.A., and Bandler, R. (1992). Longitudinal neuronal organization of defensive reactions in the midbrain periaqueductal gray region of the rat. *Exp. Brain Res.* 90: 307–318.
- Descoeur, J., Pereira, V., Pizzoccaro, A., Francois, A., Ling, B., Maffre, V., et al. (2011). Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. *EMBO Mol. Med.* 3: 266–278.
- Deutsch, D.G., Ueda, N., and Yamamoto, S. (2002). The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66: 201–210.
- Devane, W.A., Dysarz, F.A., Johnson, M.R., Melvin, L.S., and Howlett, A.C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 34: 605–613.
- Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., et al. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258: 1946–1949.
- Devilliers, M., Busserolles, J., Lolignier, S., Deval, E., Pereira, V., Alloui, A., et al. (2013). Activation of TREK-1 by morphine results in analgesia without adverse side effects. *Nat. Commun.* 4: 2941.
- Dewall, C.N., Macdonald, G., Webster, G.D., Masten, C.L., Baumeister, R.F., Powell, C., et al. (2010). Acetaminophen reduces social pain: behavioral and neural evidence. *Psychol. Sci.* 21: 931–937.
- Dhaka, A., Viswanath, V., and Patapoutian, A. (2006). Trp Ion Channels and Temperature Sensation. *Annu. Rev. Neurosci.* 29: 135–161.
- Dinchuk, J.E., Liu, R.Q., and Trzaskos, J.M. (2003). COX-3: in the wrong frame in mind. *Immunol. Lett.* 86: 121.
- Diochot, S., Baron, A., Salinas, M., Douguet, D., Scarzello, S., Dabert-Gay, A.-S., et al. (2012). Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain. *Nature* 490: 552–555.
- Dippel, D.W., Breda, E.J. van, Worp, H.B. van der, Gemert, H.M.A. van, Meijer, R.J., Kappelle, L.J., et al. (2003). Effect of paracetamol (acetaminophen) and ibuprofen on body temperature in acute ischemic stroke PISA, a phase II double-blind, randomized, placebo-controlled trial [ISRCTN98608690]. *BMC Cardiovasc. Disord.* 3: 2.
- Dogrul, A., Gardell, L.R., Ossipov, M.H., Tulunay, F.C., Lai, J., and Porreca, F. (2003). Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers. *Pain* 105: 159–168.
- Dogrul, A., Seyrek, M., Akgul, E.O., Cayci, T., Kahraman, S., and Bolay, H. (2012a). Systemic paracetamol-induced analgesic and antihyperalgesic effects through activation of descending serotonergic pathways involving spinal 5-HT7 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 677: 93–101.
- Dogrul, A., Seyrek, M., Yalcin, B., and Ulugol, A. (2012b). Involvement of descending serotonergic and noradrenergic pathways in CB1 receptor-mediated antinociception. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 38: 97–105.
- Dray, A., Bettaney, J., and Forster, P. (1990). Actions of capsaicin on peripheral nociceptors of the neonatal rat spinal cord-tail in vitro: dependence of extracellular ions and independence of second messengers. *Br. J. Pharmacol.* 101: 727.
- Drew, G.M., Lau, B.K., and Vaughan, C.W. (2009). Substance P Drives Endocannabinoid-Mediated

Disinhibition in a Midbrain Descending Analgesic Pathway. *J. Neurosci.* 29: 7220–7229.

Drew, G.M., Mitchell, V.A., and Vaughan, C.W. (2008). Glutamate Spillover Modulates GABAergic Synaptic Transmission in the Rat Midbrain Periaqueductal Grey via Metabotropic Glutamate Receptors and Endocannabinoid Signaling. *J. Neurosci.* 28: 808–815.

Dubois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., Putte, L.B.A.V.D., et al. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 12: 1063–1073.

Duggan, S.T., and Scott, L.J. (2009). Intravenous Paracetamol (Acetaminophen). *Drugs* 69: 101–113.

Dujardin, E., and Jürgens, U. (2005). Afferents of vocalization-controlling periaqueductal regions in the squirrel monkey. *Brain Res.* 1034: 114–131.

E

Eippert, F., Bingel, U., Schoell, E.D., Yacubian, J., Klingler, R., Lorenz, J., et al. (2009). Activation of the opioidergic descending pain control system underlies placebo analgesia. *Neuron* 63: 533–543.

Ellis, R.J., Toperoff, W., Vaida, F., Brande, G. van den, Gonzales, J., Gouaux, B., et al. (2009). Smoked medicinal cannabis for neuropathic pain in HIV: a randomized, crossover clinical trial. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 34: 672–680.

Engström Ruud, L., Wilhelms, D.B., Eskilsson, A., Vasilache, A.M., Elander, L., Engblom, D., et al. (2013). Acetaminophen reduces lipopolysaccharide-induced fever by inhibiting cyclooxygenase-2. *Neuropharmacology* 71: 124–129.

Ericson, A., Nur, E.M., Petersson, F., and Kechagias, S. (2009). The Effects of Capsaicin on Gastrin Secretion in Isolated Human Antral Glands: Before and After Ingestion of Red Chilli. *Dig. Dis. Sci.* 54: 491–498.

Erspamer, V. (1952). [Biological significance of enteramine, 5-hydro-tryptamine]. *Arch. Ital. Sci. Farmacol.* 2: 243–245.

F

Fathelrahman, A.I., Rahman, A.F. Ab, and Mohd Zain, Z. (2008). Self-poisoning by drugs and chemicals: variations in demographics, associated factors and final outcomes. *Gen. Hosp. Psychiatry* 30: 467–470.

Fegley, D., Kathuria, S., Mercier, R., Li, C., Goutopoulos, A., Makriyannis, A., et al. (2004). Anandamide transport is independent of fatty-acid amide hydrolase activity and is blocked by the hydrolysis-resistant inhibitor AM1172. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 8756–8761.

Ferrari, R.A., Ward, S.J., Zobre, C.M., Liew, D.K. Van, Perrone, M.H., Connell, M.J., et al. (1990). Estimation of the in vivo effect of cyclooxygenase inhibitors on prostaglandin E2 levels in mouse brain. *Eur. J. Pharmacol.* 179: 25–34.

Ferreira, S.H., Lorenzetti, B.B., and Correa, F.M. (1978). Blockade of central and peripheral generation of prostaglandins explains the antialgic effect of aspirin like drugs. *Pol J Pharmacol Pharm* 30: 133–40.

Flanagan, J.M., Gerber, A.L., Cadet, J.L., Beutler, E., and Sipe, J.C. (2006). The fatty acid amide hydrolase 385 A/A (P129T) variant: haplotype analysis of an ancient missense mutation and validation of risk for drug addiction. *Hum. Genet.* 120: 581–588.

Flatters, S.J., and Bennett, G.J. (2004). Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain* 109: 150–161.

Flower, R.J., and Vane, J.R. (1972). Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). *Nature* 240: 410–411.

Forde, G. (2007). Adjuvant analgesics for the treatment of neuropathic pain: evaluating efficacy and safety profiles. *J. Fam. Pract.* 56: 3–12.

- Fowler, C.J. (2012). Anandamide uptake explained? *Trends Pharmacol. Sci.* 33: 181–185.
- Fowler, C.J., Holt, S., Nilsson, O., Jonsson, K.-O., Tiger, G., and Jacobsson, S.O.P. (2005). The endocannabinoid signaling system: Pharmacological and therapeutic aspects. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81: 248–262.
- Fowler, C.J., and Jacobsson, S.O.P. (2002). Cellular transport of anandamide, 2-arachidonoylglycerol and palmitoylethanolamide—targets for drug development? *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66: 193–200.
- Fowler, C.J., Tiger, G., Ligresti, A., López-Rodríguez, M.L., and Marzo, V. Di (2004). Selective inhibition of anandamide cellular uptake versus enzymatic hydrolysis—a difficult issue to handle. *Eur. J. Pharmacol.* 492: 1–11.
- Francois, A., Kerckhove, N., Meleine, M., Alloui, A., Barrere, C., Gelot, A., et al. (2013). State-dependent properties of a new T-type calcium channel blocker enhance CaV3.2 selectivity and support analgesic effects. *PAIN* 154: 283–293.
- François, A., Schüetter, N., Laffray, S., Sanguesa, J., Pizzoccaro, A., Dubel, S., et al. (2015). The Low-Threshold Calcium Channel Cav3.2 Determines Low-Threshold Mechanoreceptor Function. *Cell Rep.* 10: 370–382.
- Freund, T.F., Katona, I., and Piomelli, D. (2003). Role of Endogenous Cannabinoids in Synaptic Signaling. *Physiol. Rev.* 83: 1017–1066.
- Fukuda, M., Kitaichi, K., Abe, F., Fujimoto, Y., Takagi, K., Takagi, K., et al. (2005). Altered brain penetration of diclofenac and mefenamic acid, but not acetaminophen, in Shiga-like toxin II-treated mice. *J. Pharmacol. Sci.* 97: 525–532.
- Gaddum, J.H., and Picarelli, Z.P. (1957). Two kinds of tryptamine receptor. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 12: 323.
- Gaetani, S., Cuomo, V., and Piomelli, D. (2003). Anandamide hydrolysis: a new target for anti-anxiety drugs? *Trends Mol. Med.* 9: 474–478.
- Galiègue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carrière, D., Carayon, P., et al. (1995). Expression of Central and Peripheral Cannabinoid Receptors in Human Immune Tissues and Leukocyte Subpopulations. *Eur. J. Biochem.* 232: 54–61.
- Gao, K., and Mason, P. (2000). Serotonergic Raphe Magnus Cells That Respond to Noxious Tail Heat Are Not on or off Cells. *J. Neurophysiol.* 84: 1719–1725.
- Gao, K., and Mason, P. (2001). Physiological and anatomic evidence for functional subclasses of serotonergic raphe magnus cells. *J. Comp. Neurol.* 439: 426–439.
- Gavva, N.R., Bannon, A.W., Surapaneni, S., Hovland, D.N., Lehto, S.G., Gore, A., et al. (2007). The Vanilloid Receptor TRPV1 Is Tonicly Activated In Vivo and Involved in Body Temperature Regulation. *J. Neurosci.* 27: 3366–3374.
- Gazzard, B.G., Ford-Hutchinson, A.W., Smith, M.J., and Williams, R. (1973). The binding of paracetamol to plasma proteins of man and pig. *J. Pharm. Pharmacol.* 25: 964–967.
- Gebhart, G.F. (1982). Opiate and opioid peptide effects on brain stem neurons: Relevance to nociception and antinociceptive mechanisms. *Pain* 12: 93–140.
- Gebhart, G.F., Sandkuhler, J., Thalhammer, J.G., and Zimmermann, M. (1983). Inhibition of spinal nociceptive information by stimulation in midbrain of the cat is blocked by lidocaine microinjected in nucleus raphe magnus and medullary reticular formation. *J. Neurophysiol.* 50: 1446–1459.
- Gérard, C.M., Mollereau, C., Vassart, G., and Parmentier, M. (1991). Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem. J.* 279: 129.
- Gerin, C., Teilhac, J.-R., Smith, K., and Privat, A. (2008). Motor activity induces release of serotonin in the dorsal horn of the rat lumbar spinal cord. *Neurosci. Lett.* 436: 91–95.

G

- Giuffrida, A., Beltramo, M., and Piomelli, D. (2001). Mechanisms of Endocannabinoid Inactivation: Biochemistry and Pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298: 7–14.
- Giuffrida, A., Rodriguez de Fonseca, F., Nava, F., Loubet-Lescoulié, P., and Piomelli, D. (2000). Elevated circulating levels of anandamide after administration of the transport inhibitor, AM404. *Eur. J. Pharmacol.* 408: 161–168.
- Glaser, S.T., Gatley, S.J., and Gifford, A.N. (2006). Ex Vivo Imaging of Fatty Acid Amide Hydrolase Activity and Its Inhibition in the Mouse Brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316: 1088–1097.
- Gobbi, G., Bambico, F.R., Mangieri, R., Bortolato, M., Campolongo, P., Solinas, M., et al. (2005). Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 18620–18625.
- Godfrey, L., Yan, L., Clarke, G.D., Ledent, C., Kitchen, I., and Hourani, S.M.O. (2006). Modulation of paracetamol antinociception by caffeine and by selective adenosine A2 receptor antagonists in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 531: 80–86.
- Gonçalves, L., Almeida, A., and Pertovaara, A. (2007). Pronociceptive changes in response properties of rostroventromedial medullary neurons in a rat model of peripheral neuropathy. *Eur. J. Neurosci.* 26: 2188–2195.
- González, S., Romero, J., Miguel, R. de, Lastres-Becker, I., Villanua, M.A., Makriyannis, A., et al. (1999). Extrapyramidal and neuroendocrine effects of AM404, an inhibitor of the carrier-mediated transport of anandamide. *Life Sci.* 65: 327–336.
- Gould, G.G., Seillier, A., Weiss, G., Giuffrida, A., Burke, T.F., Hensler, J.G., et al. (2012). Acetaminophen differentially enhances social behavior and cortical cannabinoid levels in inbred mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 38: 260–269.
- Graham, G.G., Davies, M.J., Day, R.O., Mohamudally, A., and Scott, K.F. (2013). The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacology* 21: 201–232.
- Graham, G.G., and Scott, K.F. (2005). Mechanism of action of paracetamol. *Am. J. Ther.* 12: 46–55.
- Gray, A.M., Pounds-Cornish, E., Eccles, F.J.R., Aziz, T.Z., Green, A.L., and Scott, R.B. (2014). Deep brain stimulation as a treatment for neuropathic pain: a longitudinal study addressing neuropsychological outcomes. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* 15: 283–292.
- Green, A.L., Wang, S., Bittar, R.G., Owen, S.L.F., Paterson, D.J., Stein, J.F., et al. (2007). Deep brain stimulation: a new treatment for hypertension? *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* 14: 592–595.
- Green, A.L., Wang, S., Owen, S.L.F., Paterson, D.J., Stein, J.F., and Aziz, T.Z. (2006a). Controlling the heart via the brain: a potential new therapy for orthostatic hypotension. *Neurosurgery* 58: 1176–1183; discussion 1176–1183.
- Green, A.L., Wang, S., Owen, S.L.F., Xie, K., Bittar, R.G., Stein, J.F., et al. (2006b). Stimulating the human midbrain to reveal the link between pain and blood pressure. *Pain* 124: 349–359.
- Green, A.L., Wang, S., Owen, S.L.F., Xie, K., Liu, X., Paterson, D.J., et al. (2005). Deep brain stimulation can regulate arterial blood pressure in awake humans. *Neuroreport* 16: 1741–1745.
- Gregg, L.C., Jung, K.-M., Spradley, J.M., Nyilas, R., Suplita, R.L., Zimmer, A., et al. (2012). Activation of Type 5 Metabotropic Glutamate Receptors and Diacylglycerol Lipase- α Initiates 2-Arachidonoylglycerol Formation and Endocannabinoid-Mediated Analgesia. *J. Neurosci.* 32: 9457–9468.
- Guimarães, A.P., Guimarães, F.S., and Prado, W.A. (2000). Modulation of carbachol-induced antinociception from the rat periaqueductal gray. *Brain Res. Bull.* 51: 471–478.
- Guindon, J., Desroches, J., and Beaulieu, P. (2007). The antinociceptive effects of intraplantar injections of 2-arachidonoyl glycerol are mediated by cannabinoid CB2 receptors. *Br. J. Pharmacol.* 150: 693–701.

- Guindon, J., Lai, Y., Takacs, S.M., Bradshaw, H.B., and Hohmann, A.G. (2013). Alterations in endocannabinoid tone following chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Effects of endocannabinoid deactivation inhibitors targeting fatty-acid amide hydrolase and monoacylglycerol lipase in comparison to reference analgesics following cisplatin treatment. *Pharmacol. Res.* 67: 94–109.
- Gunnell, D., Hawton, K., Murray, V., Garnier, R., Bismuth, C., Fagg, J., et al. (1997). Use of paracetamol for suicide and non-fatal poisoning in the UK and France: are restrictions on availability justified? *J. Epidemiol. Community Health* 51: 175–179.
- ## H
- Haley, T.J., and McCormick, W.G. (1957). Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 12: 12.
- Haller, V.L., Cichewicz, D.L., and Welch, S.P. (2006). Non-cannabinoid CB1, non-cannabinoid CB2 antinociceptive effects of several novel compounds in the PPQ stretch test in mice. *Eur J Pharmacol* 546: 60–8.
- Hamlin, K.E., and Fischer, F.E. (1951). THE SYNTHESIS OF 5-HYDROXYTRYPTAMINE. *J. Am. Chem. Soc.* 73: 5007–5008.
- Hammond, D.L., Tyce, G.M., and Yaksh, T.L. (1985). Efflux of 5-hydroxytryptamine and noradrenaline into spinal cord superfusates during stimulation of the rat medulla. *J. Physiol.* 359: 151–162.
- Han, B., Wright, R., Kirchhoff, A.M., Chester, J.A., Cooper, B.R., Davisson, V.J., et al. (2013). Quantitative LC–MS/MS analysis of arachidonoyl amino acids in mouse brain with treatment of FAAH inhibitor. *Anal. Biochem.* 432: 74–81.
- Hanel, A.M., and Lands, W.E.M. (1982). Modification of anti-inflammatory drug effectiveness by ambient lipid peroxides. *Biochem. Pharmacol.* 31: 3307–3311.
- Harvison, P.J., Egan, R.W., Gale, P.H., Christian, G.D., Hill, B.S., and Nelson, S.D. (1988). Acetaminophen and analogs as cosubstrates and inhibitors of prostaglandin H synthase. *Chem. Biol. Interact.* 64: 251–266.
- Hasanein, P. (2009). The endocannabinoid transport inhibitor AM404 modulates nociception in cholestasis. *Neurosci. Lett.* 462: 230–234.
- Hasanein, P., and Soltani, N. (2009). Effects of the endocannabinoid transport inhibitors AM404 and UCM707 on diabetic neuropathy in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 36: 1127–1131.
- Hawton, K., Bergen, H., Simkin, S., Dodd, S., Pocock, P., Bernal, W., et al. (2013). Long term effect of reduced pack sizes of paracetamol on poisoning deaths and liver transplant activity in England and Wales: interrupted time series analyses. *BMJ* 346: f403–f403.
- Hazai, E., Vereczkey, L., and Monostory, K. (2002). Reduction of Toxic Metabolite Formation of Acetaminophen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291: 1089–1094.
- Heading, R.C., Nimmo, J., Prescott, L.F., and Tothill, P. (1973). The dependence of paracetamol absorption on the rate of gastric emptying. *Br. J. Pharmacol.* 47: 415–421.
- Hegyvi, Z., Kis, G., Holló, K., Ledent, C., and Antal, M. (2009). Neuronal and glial localization of the cannabinoid-1 receptor in the superficial spinal dorsal horn of the rodent spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 30: 251–262.
- Heinricher, M.M., and Ingram, S.L. (2008). 5.41 - The Brainstem and Nociceptive Modulation. In *The Senses: A Comprehensive Reference*, Volume Editors: Allan I. Basbaum, Akimichi Kaneko, Gordon M. Shepherd, Gerald Westheimer, Thomas D. Albright, Richard H. Masland, et al., eds. (New York: Academic Press), pp 593–626.
- Heinricher, M.M., Tavares, I., Leith, J.L., and Lumb, B.M. (2009). Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res. Rev.* 60: 214–225.
- Hendershot, L.C., and Forsaith, J. (1959). Antagonism of the Frequency of Phenylquinone-Induced

- Writhing in the Mouse by Weak Analgesics and Nonanalgesics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 125: 237–240.
- Henderson, A.J., and Shaheen, S.O. (2013). Acetaminophen and asthma. *Paediatr. Respir. Rev.* 14: 9–16.
- Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., Costa, B. de, and Rice, K.C. (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci.* 11: 563–583.
- Heyman, I., and Rang, H.P. (1985). Depolarizing responses to capsaicin in a subpopulation of rat dorsal root ganglion cells. *Neurosci. Lett.* 56: 69–75.
- Hinsberg O., and Treupel G (1894). Ueber die physiologische Wirkung des p-Aminophenols und einiger Derivate desselben. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Für Exp. Pathol. Pharmakol.* 216– 50.
- Hinz, B., and Brune, K. (2012). Paracetamol and Cyclooxygenase Inhibition: Is There a Cause for Concern? *Ann. Rheum. Dis.* 71: 20–25.
- Hochberg, M.C., Altman, R.D., April, K.T., Benkhalti, M., Guyatt, G., McGowan, J., et al. (2012). American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Arthritis Care Res.* 64: 465–474.
- Hogestatt, E.D., Jonsson, B.A., Ermund, A., Andersson, D.A., Bjork, H., Alexander, J.P., et al. (2005). Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. *J Biol Chem* 280: 31405–12.
- Högestätt, E.D., Jönsson, B.A.G., Ermund, A., Andersson, D.A., Björk, H., Alexander, J.P., et al. (2005). Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. *J. Biol. Chem.* 280: 31405–31412.
- Hohmann, A.G., Farthing, J.N., Zvonok, A.M., and Makriyannis, A. (2004). Selective Activation of Cannabinoid CB2 Receptors Suppresses Hyperalgesia Evoked by Intradermal Capsaicin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308: 446–453.
- Hohmann, A.G., and Herkenham, M. (1999). Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves. *Neuroscience* 92: 1171–1175.
- Hohmann, A.G., and Suplita, R.L. (2006). Endocannabinoid mechanisms of pain modulation. *AAPS J.* 8: E693–E708.
- Hohmann, A.G., Suplita, R.L., Bolton, N.M., Neely, M.H., Fegley, D., Mangieri, R., et al. (2005). An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature* 435: 1108–1112.
- Hohmann, A.G., Tsou, K., and Walker, J.M. (1998). Cannabinoid modulation of wide dynamic range neurons in the lumbar dorsal horn of the rat by spinally administered WIN55,212-2. *Neurosci. Lett.* 257: 119–122.
- Holzer, P. (2004). TRPV1 and the gut: from a tasty receptor for a painful vanilloid to a key player in hyperalgesia. *Eur. J. Pharmacol.* 500: 231–241.
- Holzer, P. (2007). Taste Receptors in the Gastrointestinal Tract. V. Acid sensing in the gastrointestinal tract. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 292: G699–G705.
- Holzer, P. (2011). Transient receptor potential (TRP) channels as drug targets for diseases of the digestive system. *Pharmacol. Ther.* 131: 142–170.
- Hong, S., and Wiley, J.W. (2005). Early Painful Diabetic Neuropathy Is Associated with Differential Changes in the Expression and Function of Vanilloid Receptor 1. *J. Biol. Chem.* 280: 618–627.
- Horvath, T.L., Peyron, C., Diano, S., Ivanov, A., Aston-Jones, G., Kilduff, T.S., et al. (1999). Hypocretin (orexin) activation and synaptic innervation of the locus coeruleus noradrenergic system. *J. Comp. Neurol.* 415: 145–159.
- Ho, Y.-C., Cheng, J.-K., and Chiou, L.-C. (2013). Hypofunction of Glutamatergic Neurotransmission in the Periaqueductal Gray Contributes to Nerve-Injury-Induced Neuropathic Pain. *J. Neurosci.* 33: 7825–7836.

Ho, Y.-C., Lee, H.-J., Tung, L.-W., Liao, Y.-Y., Fu, S.-Y., Teng, S.-F., et al. (2011). Activation of Orexin 1 Receptors in the Periaqueductal Gray of Male Rats Leads to Antinociception via Retrograde Endocannabinoid (2-Arachidonoylglycerol)-Induced Disinhibition. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*: 14600–14610.

Hoyer, D., Hannon, J.P., and Martin, G.R. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *71*: 533–554.

Hu, S.S.-J., Ho, Y.-C., and Chiou, L.-C. (2014). No more pain upon Gq-protein-coupled receptor activation: role of endocannabinoids. *Eur. J. Neurosci.* *39*: 467–484.

I

Israel, F.J., Parker, G., Charles, M., and Reymond, L. (2010). Lack of benefit from paracetamol (acetaminophen) for palliative cancer patients requiring high-dose strong opioids: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *J. Pain Symptom Manage.* *39*: 548–554.

J

Jaggi, A.S., and Singh, N. (2011). Role of different brain areas in peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. *Brain Res.* *1381*: 187–201.

Jarrahan, A., Manna, S., Edgemond, W.S., Campbell, W.B., and Hillard, C.J. (2000). Structure—Activity Relationships Among N-Arachidonylethanolamine (Anandamide) Head Group Analogues for the Anandamide Transporter. *J. Neurochem.* *74*: 2597–2606.

Jayamanne, A., Greenwood, R., Mitchell, V.A., Aslan, S., Piomelli, D., and Vaughan, C.W. (2006). Actions of the FAAH inhibitor URB597 in neuropathic and inflammatory chronic pain models. *Br. J. Pharmacol.* *147*: 281–288.

Jeong, H.-J., Chenu, D., Johnson, E.E., Connor, M., and Vaughan, C.W. (2008). Sumatriptan inhibits synaptic transmission in the rat midbrain periaqueductal grey. *Mol. Pain* *4*: 54.

Jeong, H.-J., Lam, K., Mitchell, V.A., and Vaughan, C.W. (2013). Serotonergic modulation of neuronal activity in rat midbrain periaqueductal gray. *J. Neurophysiol.* *109*: 2712–2719.

Jhaveri, M.D., Richardson, D., and Chapman, V. (2007). Endocannabinoid metabolism and uptake: novel targets for neuropathic and inflammatory pain. *Br. J. Pharmacol.* *152*: 624–632.

Johnson, J.R., Burnell-Nugent, M., Lossignol, D., Ganae-Motan, E.D., Potts, R., and Fallon, M.T. (2010). Multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study of the efficacy, safety, and tolerability of THC:CBD extract and THC extract in patients with intractable cancer-related pain. *J. Pain Symptom Manage.* *39*: 167–179.

Johnson, P.L., Lightman, S.L., and Lowry, C.A. (2004). A functional subset of serotonergic neurons in the rat ventrolateral periaqueductal gray implicated in the inhibition of sympathoexcitation and panic. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1018*: 58–64.

Jones, P.G., and Dunlop, J. (2007). Targeting the cholinergic system as a therapeutic strategy for the treatment of pain. *Neuropharmacology* *53*: 197–206.

Jones, R.L. (1972). Functions of prostaglandins. *Pathobiol. Annu.* *2*: 359–380.

Jo, Y.-H., Chen, Y.-J.J., Chua, S.C., Talmage, D.A., and Role, L.W. (2005). Integration of endocannabinoid and leptin signaling in an appetite-related neural circuit. *Neuron* *48*: 1055–1066.

Jung, J.S., Song, D.K., Suh, H.W., and Kim, Y.H. (1994). Effects of intraventricular injection of morphine and beta-endorphin on serotonin release from the spinal cord in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *49*: 1037–1042.

K

- Kalliomäki, J., Annas, P., Huizar, K., Clarke, C., Zettergren, A., Karlsten, R., et al. (2013). Evaluation of the analgesic efficacy and psychoactive effects of AZD1940, a novel peripherally acting cannabinoid agonist, in human capsaicin-induced pain and hyperalgesia. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *40*: 212–218.
- Kang, Y.-J., Mbonye, U.R., DeLong, C.J., Wada, M., and Smith, W.L. (2007). Regulation of intracellular cyclooxygenase levels by gene transcription and protein degradation. *Prog. Lipid Res.* *46*: 108–125.
- Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimoto-dani, Y., Uchigashima, M., and Watanabe, M. (2009). Endocannabinoid-Mediated Control of Synaptic Transmission. *Physiol. Rev.* *89*: 309–380.
- Karlsson, U., Sundgren-Andersson, A.K., Johansson, S., and Krupp, J.J. (2005). Capsaicin augments synaptic transmission in the rat medial preoptic nucleus. *Brain Res.* *1043*: 1–11.
- Karst, M., and Wippermann, S. (2009). Cannabinoids against pain. Efficacy and strategies to reduce psychoactivity: a clinical perspective. *Expert Opin. Investig. Drugs* *18*: 125–133.
- Kathuria, S., Gaetani, S., Fegley, D., Valiño, F., Duranti, A., Tontini, A., et al. (2003). Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat. Med.* *9*: 76–81.
- Kato, M., Taguchi, K., Hagiwara, Y., and Kubo, T. (1996). Effects of electrical stimulation and morphine microinjection into periaqueductal gray on 5-hydroxyindole oxidation current in spinal cord of cats. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* *27*: 1195–1201.
- Kauer, J.A., and Gibson, H.E. (2009). Hot flash: TRPV channels in the brain. *Trends Neurosci* *32*: 215–24.
- Kawahara, H., Drew, G., Christie, M., and Vaughan, C. (2011). Inhibition of fatty acid amide hydrolase unmasks CB(1) receptor and TRPV1 channel-mediated modulation of glutamatergic synaptic transmission in midbrain periaqueductal grey. *Br. J. Pharmacol.* *163*: 1214–1222.
- Kawamata, T., Omote, K., Toriyabe, M., Kawamata, M., and Namiki, A. (2002). Intracerebroventricular morphine produces antinociception by evoking gamma-aminobutyric acid release through activation of 5-hydroxytryptamine 3 receptors in the spinal cord. *Anesthesiology* *96*: 1175–1182.
- Kayser, V., Elfassi, I.E., Aubel, B., Melfort, M., Julius, D., Gingrich, J.A., et al. (2007). Mechanical, thermal and formalin-induced nociception is differentially altered in 5-HT1A^{-/-}, 5-HT1B^{-/-}, 5-HT2A^{-/-}, 5-HT3A^{-/-} and 5-HTT^{-/-} knock-out male mice. *Pain* *130*: 235–248.
- Kendall, D., and Alexander, S. (2009). *Behavioral Neurobiology of the Endocannabinoid System* (Springer).
- Kerckhove, N., Mallet, C., François, A., Boudes, M., Chemin, J., Voets, T., et al. (2014). Cav3.2 calcium channels: The key protagonist in the supraspinal effect of paracetamol. *PAIN®* *155*: 764–772.
- Kikkawa, R., Fujikawa, M., Yamamoto, T., Hamada, Y., Yamada, H., and Horii, I. (2006). ‘In vivo’ hepatotoxicity study of rats in comparison with ‘in vitro’ hepatotoxicity screening system. *J. Toxicol. Sci.* *31*: 23–34.
- Kimura, M., Saito, S., and Obata, H. (2012). Dexmedetomidine decreases hyperalgesia in neuropathic pain by increasing acetylcholine in the spinal cord. *Neurosci. Lett.* *529*: 70–74.
- Kinsey, S.G., Long, J.Z., O’Neal, S.T., Abdullah, R.A., Poklis, J.L., Boger, D.L., et al. (2009). Blockade of endocannabinoid-degrading enzymes attenuates neuropathic pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *330*: 902–910.
- Kinsey, S.G., Naidu, P.S., Cravatt, B.F., Dudley, D.T., and Lichtman, A.H. (2011). Fatty acid amide hydrolase blockade attenuates the development of collagen-induced arthritis and related thermal hyperalgesia in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *99*: 718–725.
- Kirkham, T.C., Williams, C.M., Fezza, F., and Marzo, V.D. (2002). Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting,

- feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br. J. Pharmacol.* *136*: 550–557.
- Kis, B., Snipes, J.A., Isse, T., Nagy, K., and Busija, D.W. (2003). Putative Cyclooxygenase-3 Expression in Rat Brain Cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *23*: 1287–1292.
- Kishimoto, K., Koyama, S., and Akaike, N. (2001). Synergistic mu-opioid and 5-HT1A presynaptic inhibition of GABA release in rat periaqueductal gray neurons. *Neuropharmacology* *41*: 529–538.
- Klafke, J.Z., Silva, M.A. da, Trevisan, G., Rossato, M.F., Silva, C.R. da, Guerra, G.P., et al. (2012). Involvement of the glutamatergic system in the nociception induced intrathecally for a TRPA1 agonist in rats. *Neuroscience* *222*: 136–146.
- Knotkova, H., Pappagallo, M., and Szallasi, A. (2008). Capsaicin (TRPV1 Agonist) therapy for pain relief: farewell or revival? *Clin. J. Pain* *24*: 142–154.
- Kock, M. De, Eisenach, J., Tong, C., Schmitz, A., and Scholtès, J. (1997). Analgesic Doses of Intrathecal but Not Intravenous Clonidine Increase Acetylcholine in Cerebrospinal Fluid in Humans. [Miscellaneous Article]. *Anesth. Analg.* April 1997 *84*: 800–803.
- Kosaka, T., Miyata, A., Ihara, H., Hara, S., Sugimoto, T., Takeda, O., et al. (1994). Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *Eur. J. Biochem.* *221*: 889–897.
- L**
- Laba, T.-L., Brien, J., Fransen, M., and Jan, S. (2013). Patient preferences for adherence to treatment for osteoarthritis: the MEdication Decisions in Osteoarthritis Study (MEDOS). *BMC Musculoskelet. Disord.* *14*: 160.
- Lambert, D.M. (2002). Les vertus thérapeutiques du cannabis à travers les millénaires. *J Pharm Belg* *21*–29.
- Landry, Y., and Gies, J.-P. (2014). *Pharmacologie - 3e édition: Des cibles à la thérapeutique* (Dunod).
- Latini, S., and Pedata, F. (2001). Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J. Neurochem.* *79*: 463–484.
- Lau, B.K., Drew, G.M., Mitchell, V.A., and Vaughan, C.W. (2014). Endocannabinoid modulation by FAAH and MAGL within the analgesic circuitry of the periaqueductal grey. *Br. J. Pharmacol.* n/a–n/a.
- Lau, B.K., and Vaughan, C.W. (2008). Muscarinic Modulation of Synaptic Transmission via Endocannabinoid Signalling in the Rat Midbrain Periaqueductal Gray. *Mol. Pharmacol.* *74*: 1392 – 1398.
- Lau, B.K., and Vaughan, C.W. (2014). Descending modulation of pain: the GABA disinhibition hypothesis of analgesia. *Curr. Opin. Neurobiol.* *29C*: 159–164.
- Lee, Y.-S., Kim, H., Brahim, J.S., Rowan, J., Lee, G., and Dionne, R.A. (2007). Acetaminophen selectively suppresses peripheral prostaglandin E2 release and increases COX-2 gene expression in a clinical model of acute inflammation. *PAIN* *129*: 279–286.
- Lei, J., Sun, T., Lumb, B.M., and You, H.-J. (2014). Roles of the periaqueductal gray in descending facilitatory and inhibitory controls of intramuscular hypertonic saline induced muscle nociception. *Exp. Neurol.*
- Leong, M.L., Gu, M., Speltz-Paiz, R., Stahura, E.I., Mottey, N., Steer, C.J., et al. (2011). Neuronal loss in the rostral ventromedial medulla in a rat model of neuropathic pain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*: 17028–17039.
- Leonis, M.A., Alonso, E.M., Im, K., Belle, S.H., and Squires, R.H. (2013). Chronic Acetaminophen Exposure in Pediatric Acute Liver Failure. *Pediatrics* *131*: e740–e746.
- Liao, H.-T., Lee, H.-J., Ho, Y.-C., and Chiou, L.-C. (2011). Capsaicin in the periaqueductal gray induces analgesia via metabotropic glutamate receptor-mediated endocannabinoid retrograde disinhibition. *Br. J. Pharmacol.* *163*: 330–345.

- Libert, F., Bonnefont, J., Bourinet, E., Doucet, E., Alloui, A., Hamon, M., et al. (2004). Acetaminophen: A Central Analgesic Drug That Involves a Spinal Tropisetron-Sensitive, Non-5-HT₃ Receptor-Mediated Effect. *Mol. Pharmacol.* 66: 728–734.
- Lichtman, A.H., Cook, S.A., and Martin, B.R. (1996). Investigation of brain sites mediating cannabinoid-induced antinociception in rats: evidence supporting periaqueductal gray involvement. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276: 585–593.
- Lichtman, A.H., Hawkins, E.G., Griffin, G., and Cravatt, B.F. (2002). Pharmacological Activity of Fatty Acid Amides Is Regulated, but Not Mediated, by Fatty Acid Amide Hydrolase in Vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302: 73–79.
- Lichtman, A.H., and Martin, B.R. (1991). Spinal and supraspinal components of cannabinoid-induced antinociception. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258: 517–523.
- Lichtman, A.H., Shelton, C.C., Advani, T., and Cravatt, B.F. (2004). Mice lacking fatty acid amide hydrolase exhibit a cannabinoid receptor-mediated phenotypic hypoalgesia. *Pain* 109: 319–327.
- Li, D.-P., Chen, S.-R., Pan, Y.-Z., Levey, A.I., and Pan, H.-L. (2002). Role of presynaptic muscarinic and GABAB receptors in spinal glutamate release and cholinergic analgesia in rats. *J. Physiol.* 543: 807–818.
- Liebeskind, J.C., Guilbaud, G., Besson, J.M., and Oliveras, J.L. (1973). Analgesia from electrical stimulation of the periaqueductal gray matter in the cat: behavioral observations and inhibitory effects on spinal cord interneurons. *Brain Res.* 50: 441–446.
- Liew, Z., Ritz, B., Rebordosa, C., Lee, P.-C., and Olsen, J. (2014). Acetaminophen use during pregnancy, behavioral problems, and hyperkinetic disorders. *JAMA Pediatr.* 168: 313–320.
- Linnman, C., Moulton, E.A., Barmettler, G., Becerra, L., and Borsook, D. (2011). Neuroimaging of the periaqueductal gray: State of the field. *NeuroImage.*
- Lisboa, S.F., and Guimarães, F.S. (2012). Differential role of CB1 and TRPV1 receptors on anandamide modulation of defensive responses induced by nitric oxide in the dorsolateral periaqueductal gray. *Neuropharmacology.*
- Lisboa, S.F., Resstel, L.B.M., Aguiar, D.C., and Guimarães, F.S. (2008). Activation of cannabinoid CB1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray induces anxiolytic effects in rats submitted to the Vogel conflict test. *Eur. J. Pharmacol.* 593: 73–78.
- Liu, F.-Y., Qu, X.-X., Ding, X., Cai, J., Jiang, H., Wan, Y., et al. (2010). Decrease in the descending inhibitory 5-HT system in rats with spinal nerve ligation. *Brain Res.* 1330: 45–60.
- Liu, J., Reid, A.R., and Sawynok, J. (2013). Antinociception by systemically-administered acetaminophen (paracetamol) involves spinal serotonin 5-HT₇ and adenosine A₁ receptors, as well as peripheral adenosine A₁ receptors. *Neurosci. Lett.*
- Lolignier, S., Amsalem, M., Maingret, F., Padilla, F., Gabriac, M., Chapuy, E., et al. (2011). Nav1.9 Channel Contributes to Mechanical and Heat Pain Hypersensitivity Induced by Subacute and Chronic Inflammation. *PLoS ONE* 6: e23083.
- Long, J.Z., Li, W., Booker, L., Burston, J.J., Kinsey, S.G., Schlosburg, J.E., et al. (2009). Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat. Chem. Biol.* 5: 37–44.
- Loyd, D.R., Henry, M.A., and Hargreaves, K.M. (2013). Serotonergic neuromodulation of peripheral nociceptors. *Semin. Cell Dev. Biol.* 24: 51–57.
- Loyd, D.R., Morgan, M.M., and Murphy, A.Z. (2007). Morphine preferentially activates the periaqueductal gray-rostral ventromedial medullary pathway in the male rat: a potential mechanism for sex differences in antinociception. *Neuroscience* 147: 456–468.
- Lubel, J.S., Angus, P.W., and Gow, P.J. (2007). Accidental paracetamol poisoning. *Med. J. Aust.* 186:
- Luchicchi, A., and Pistis, M. (2012). Anandamide and 2-arachidonoylglycerol: pharmacological properties, functional features, and emerging specificities of the two major endocannabinoids. *Mol. Neurobiol.* 46: 374–392.

M

- Macario, A., and Royal, M.A. (2011). A Literature Review of Randomized Clinical Trials of Intravenous Acetaminophen (Paracetamol) for Acute Postoperative Pain. *Pain Pract.* 11: 290–296.
- Machado, G.C., Maher, C.G., Ferreira, P.H., Pinheiro, M.B., Lin, C.-W.C., Day, R.O., et al. (2015). Efficacy and safety of paracetamol for spinal pain and osteoarthritis: systematic review and meta-analysis of randomised placebo controlled trials. *BMJ* 350: h1225.
- Mackie, K. (2005). Distribution of Cannabinoid Receptors in the Central and Peripheral Nervous System. In *Cannabinoids*, P.D.R.G. Pertwee, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp 299–325.
- Madenoglu, H., Kaçmaz, M., Aksu, R., Bicer, C., Yaba, G., Yildiz, K., et al. (2010). Effects of naloxone and flumazenil on antinociceptive action of acetaminophen in rats. *Curr. Ther. Res.* 71: 111–117.
- Mai, J.K., and Paxinos, G. (2011). *The Human Nervous System* (Academic Press).
- Maione, S., Bisogno, T., Novellis, V. de, Palazzo, E., Cristino, L., Valenti, M., et al. (2006). Elevation of endocannabinoid levels in the ventrolateral periaqueductal grey through inhibition of fatty acid amide hydrolase affects descending nociceptive pathways via both cannabinoid receptor type 1 and transient receptor potential vanilloid type-1 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316: 969–982.
- Maione, S., Marabese, I., Leyva, J., Palazzo, E., Novellis, V. de, and Rossi, F. (1998a). Characterisation of mGluRs which modulate nociception in the PAG of the mouse. *Neuropharmacology* 37: 1475–1483.
- Maione, S., Marabese, I., Oliva, P., Novellis, V. de, Stella, L., Rossi, F., et al. (1999). Periaqueductal gray matter glutamate and GABA decrease following subcutaneous formalin injection in rat. *Neuroreport* 10: 1403–1407.
- Maione, S., Oliva, P., Marabese, I., Palazzo, E., Rossi, F., Berrino, L., et al. (2000). Periaqueductal gray matter metabotropic glutamate receptors modulate formalin-induced nociception. *Pain* 85: 183–189.
- Maione, S., Palazzo, E., Novellis, V. de, Stella, L., Leyva, J., and Rossi, F. (1998b). Metabotropic glutamate receptors modulate serotonin release in the rat periaqueductal gray matter. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 358: 411–417.
- Mallet, C., Barrière, D.A., Ermund, A., Jönsson, B.A.G., Eschalier, A., Zygmunt, P.M., et al. (2010). TRPV1 in brain is involved in acetaminophen-induced antinociception. *PLoS One* 5:
- Mallet, C., Barrière, D.A., and Eschalier, A. (2012). Le paracétamol: un ancêtre plein d'avenir. *Thérapie* 67: 277–281.
- Mallet, C., Daulhac, L., Bonnefont, J., Ledent, C., Etienne, M., Chapuy, E., et al. (2008). Endocannabinoid and serotonergic systems are needed for acetaminophen-induced analgesia. *Pain* 139: 190–200.
- Mallet, C., and Eschalier, A. (2010). Pharmacology and Mechanism of Action of Acetaminophen. In *Pharmacology of Pain*, (Seattle: International Association for the Study of Pain), pp 65–86.
- Malmberg, A.B., and Yaksh, T.L. (1994). Capsaicin-evoked prostaglandin E2 release in spinal cord slices: relative effect of cyclooxygenase inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.* 271: 293–299.
- Manna, S.S.S., and Umathe, S.N. (2014). Paracetamol potentiates the antidepressant-like and anticomulsive-like effects of fluoxetine. *Behav. Pharmacol.*
- Marabese, I., Rossi, F., Palazzo, E., Novellis, V. de, Starowicz, K., Cristino, L., et al. (2007). Periaqueductal gray metabotropic glutamate receptor subtype 7 and 8 mediate opposite effects on amino acid release, rostral ventromedial medulla cell activities, and thermal nociception. *J. Neurophysiol.* 98: 43–53.
- Marsicano, G., and Lutz, B. (1999). Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur. J. Neurosci.* 11: 4213–4225.

- Marsicano, G., and Lutz, B. (2006). Neuromodulatory functions of the endocannabinoid system. *J. Endocrinol. Invest.* *29*: 27–46.
- Marsicano, G., Wotjak, C.T., Azad, S.C., Bisogno, T., Rammes, G., Cascio, M.G., et al. (2002). The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* *418*: 530–534.
- Martenson, M.E., Cetas, J.S., and Heinricher, M.M. (2009). A possible neural basis for stress-induced hyperalgesia. *Pain* *142*: 236–244.
- Martin, W.J., Lai, N.K., Patrick, S.L., Tsou, K., and Walker, J.M. (1993). Antinociceptive actions of cannabinoids following intraventricular administration in rats. *Brain Res.* *629*: 300–304.
- Marzo, V.D., Bifulco, M., and Petrocellis, L.D. (2004). The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat. Rev. Drug Discov.* *3*: 771–784.
- Marzo, V.D., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J.-C., et al. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Publ. Online* 15 Dec. 1994 Doi10.1038/372686a0 *372*: 686–691.
- Marzo, V. Di, Griffin, G., Petrocellis, L. De, Brandi, I., Bisogno, T., Williams, W., et al. (2002). A structure/activity relationship study on arvanil, an endocannabinoid and vanilloid hybrid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *300*: 984–991.
- Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., and Bonner, T.I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Publ. Online* 09 August 1990 Doi10.1038/346561a0 *346*: 561–564.
- Mauborgne, A., Poli  nor, H., Hamon, M., Cesselin, F., and Bourgoin, S. (2002). Adenosine receptor-mediated control of in vitro release of pain-related neuropeptides from the rat spinal cord. *Eur. J. Pharmacol.* *441*: 47–55.
- Mauger, A.R., Jones, A.M., and Williams, C.A. (2010). Influence of acetaminophen on performance during time trial cycling. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *108*: 98–104.
- Mbonye, U.R., and Song, I. (2009). Posttranscriptional and posttranslational determinants of cyclooxygenase expression. *BMB Rep.* *42*: 552–560.
- McGaraughty, S., Chu, K.L., Bitner, R.S., Martino, B., Kouhen, R.E., Han, P., et al. (2003). Capsaicin Infused Into the PAG Affects Rat Tail Flick Responses to Noxious Heat and Alters Neuronal Firing in the RVM. *J. Neurophysiol.* *90*: 2702–2710.
- McNicol, E.D., Tzortzopoulou, A., Cepeda, M.S., Francia, M.B.D., Farhat, T., and Schumann, R. (2011). Single-dose intravenous paracetamol or propacetamol for prevention or treatment of postoperative pain: a systematic review and meta-analysis. *Br. J. Anaesth.* *106*: 764–775.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., et al. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* *50*: 83–90.
- Melck, D., Bisogno, T., Petrocellis, L. De, Chuang, H., Julius, D., Bifulco, M., et al. (1999). Unsaturated Long-Chain N-Acyl-vanillyl-amides (N-AVAMs): Vanilloid Receptor Ligands That Inhibit Anandamide-Facilitated Transport and Bind to CB1 Cannabinoid Receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *262*: 275–284.
- Menigoz, A., and Boudes, M. (2011). The Expression Pattern of TRPV1 in Brain. *J. Neurosci.* *31*: 13025–13027.
- Mezey, E., Tóth, Z.E., Cortright, D.N., Arzubi, M.K., Krause, J.E., Elde, R., et al. (2000). Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*: 3655–3660.
- Millan, M. (2002). Descending control of pain. *Prog. Neurobiol. Progress in neurobiology*: 355–474.
- Min, D.K., Tuor, U.I., and Chelikani, P.K. (2011). Gastric distention induced functional magnetic resonance signal changes in the rodent brain. *Neuroscience* *179*: 151–158.
- Miranda, H.F., Lemus, I., and Pinardi, G. (2003). Effect of the inhibition of serotonin biosynthesis on the antinociception induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Brain Res. Bull.* *61*: 417–425.

- Miranda, H.F., Sierralta, F., and Pinardi, G. (2002). Neostigmine interactions with non steroidal anti-inflammatory drugs. *Br. J. Pharmacol.* *135*: 1591–1597.
- Mitchell, V.A., Greenwood, R., Jayamanne, A., and Vaughan, C.W. (2007). Actions of the Endocannabinoid Transport Inhibitor Am404 in Neuropathic and Inflammatory Pain Models. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *34*: 1186–1190.
- Mitchell, V.A., Jeong, H.-J., Drew, G.M., and Vaughan, C.W. (2011). Cholecystokinin exerts an effect via the endocannabinoid system to inhibit GABAergic transmission in midbrain periaqueductal gray. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *36*: 1801–1810.
- Mitchell, V.A., Kawahara, H., and Vaughan, C.W. (2009). Neurotensin inhibition of GABAergic transmission via mGluR-induced endocannabinoid signalling in rat periaqueductal grey. *J. Physiol.* *587*: 2511–2520.
- Miyakawa, T., Terashima, Y., Takebayashi, T., Tanimoto, K., Iwase, T., Ogon, I., et al. (2014). Transient receptor potential ankyrin 1 in spinal cord dorsal horn is involved in neuropathic pain in nerve root constriction rats. *Mol. Pain* *10*: 58.
- Mohammadi-Farani, A., Sahebgharani, M., Sepehrizadeh, Z., Jaber, E., and Ghazi-Khansari, M. (2010). Diabetic thermal hyperalgesia: role of TRPV1 and CB1 receptors of periaqueductal gray. *Brain Res.* *1328*: 49–56.
- Montell, C. (2005). The TRP Superfamily of Cation Channels. *Sci. Signal.* *2005*: re3.
- Moreira, F.A., Aguiar, D.C., and Guimarães, F.S. (2007). Anxiolytic-like effect of cannabinoids injected into the rat dorsolateral periaqueductal gray. *Neuropharmacology* *52*: 958–965.
- Moreno-Sanz, G., Barrera, B., Guijarro, A., Elia, I. d', Otero, J.A., Alvarez, A.I., et al. (2011). The ABC membrane transporter ABCG2 prevents access of FAAH inhibitor URB937 to the central nervous system. *Pharmacol. Res.* *64*: 359–363.
- Moreno-Sanz, G., Sasso, O., Guijarro, A., Oluyemi, O., Bertorelli, R., Reggiani, A., et al. (2012). Pharmacological characterization of the peripheral FAAH inhibitor URB937 in female rodents: interaction with the Abcg2 transporter in the blood-placenta barrier. *Br. J. Pharmacol.* *167*: 1620–1628.
- Morgan, M.M., Bobeck, E.N., and Ingram, S.L. (2009). Glutamate modulation of antinociception, but not tolerance, produced by morphine microinjection into the periaqueductal gray of the rat. *Brain Res.* *1295*: 59–66.
- Morgan, M.M., Reid, R.A., Stormann, T.M., and Lautermilch, N.J. (2014). Opioid Selective Antinociception Following Microinjection into the Periaqueductal Gray of the Rat. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.*
- Morgan, M.M., Whitney, P.K., and Gold, M.S. (1998). Immobility and flight associated with antinociception produced by activation of the ventral and lateral/dorsal regions of the rat periaqueductal gray. *Brain Res.* *804*: 159–166.
- Morisset, V., and Urban, L. (2001). Cannabinoid-Induced Presynaptic Inhibition of Glutamatergic EPSCs in Substantia Gelatinosa Neurons of the Rat Spinal Cord. *J. Neurophysiol.* *86*: 40–48.
- Morris, C.J. (2003). Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *225*: 115–121.
- Morse, H.N. (1878). Ueber eine neue Darstellungsmethode der Acetylamidophenole. *Ber Dtsch. Chem Ges* *232–233*.
- Mrozek, S., Constantin, J.-M., Futier, E., Zenut, M., Ghardes, G., Cayot-Constantin, S., et al. (2009). [Acetaminophene-induced hypotension in intensive care unit: a prospective study]. *Ann. Fr. Anesthésie Rénanimation Annales françaises d'anesthésie et de réanimation*: 448–53.
- Muller, C.P., and Jacobs, B. (2009). *Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin* (Academic Press).
- Munn, E.M., Harte, S.E., Lagman, A., and Borszcz, G.S. (2009). Contribution of the periaqueductal gray to the suppression of pain affect produced by administration of morphine into the intralaminar thalamus of rat. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* *10*: 426–435.

Munro, S., Thomas, K.L., and Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Publ. Online* 02 Sept. 1993 Doi101038365061a0 365: 61–65.

Musshoff, F., Padosch, S., Steinborn, S., and Madea, B. (2004). Fatal blood and tissue concentrations of more than 200 drugs. *Forensic Sci. Int.* 142: 161–210.

Muth-Selbach, U.S., Tegeder, I., Brune, K., and Geisslinger, G. (1999). Acetaminophen Inhibits Spinal Prostaglandin E2 Release after Peripheral Noxious Stimulation. *Anesthesiol.* July 1999 91: 231–239.

N

Naidu, P.S., Kinsey, S.G., Guo, T.L., Cravatt, B.F., and Lichtman, A.H. (2010). Regulation of inflammatory pain by inhibition of fatty acid amide hydrolase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 334: 182–190.

Nakajima, K., Obata, H., Ito, N., Goto, F., and Saito, S. (2009). The nociceptive mechanism of 5-hydroxytryptamine released into the peripheral tissue in acute inflammatory pain in rats. *Eur. J. Pain* 13: 441–447.

Nasrallah, F.A., Tan, J., and Chuang, K.-H. (2012). Pharmacological modulation of functional connectivity: α 2-adrenergic receptor agonist alters synchrony but not neural activation. *NeuroImage* 60: 436–446.

Nguyen, P., Selley, D., and Sim-Selley, L. (2010). Statistical Parametric Mapping reveals ligand and region specific activation of G-proteins by CB1 receptors and non-CB1 sites in the 3D reconstructed mouse brain. *NeuroImage* 52: 1243–1251.

Nickel, F.T., Seifert, F., Lanz, S., and Maihöfner, C. (2012). Mechanisms of neuropathic pain. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 22: 81–91.

Nieuwenhuys, R., Voogd, J., and Huijzen, C. van (2007). *The Human Central Nervous System: A Synopsis and Atlas* (Springer).

Novellis, V. de, Mariani, L., Palazzo, E., Vita, D., Marabese, I., Scafuro, M., et al. (2005). Periaqueductal grey CB1 cannabinoid and metabotropic glutamate subtype 5 receptors modulate changes in rostral ventromedial medulla neuronal activities induced by subcutaneous formalin in the rat. *Neuroscience* 134: 269–281.

Nozadze, I., Tsiklauri, N., Gurtskaia, G., Abzianidze, E., and Tsagareli, M.G. (2011). Opioid sensitivity of nucleus raphe magnus ater analgesia by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Georgian Med. News* 50–55.

O

Ohno-Shosaku, T., and Kano, M. (2014). Endocannabinoid-mediated retrograde modulation of synaptic transmission. *Curr. Opin. Neurobiol.* 29: 1–8.

Olive, G. (2006). [Analgesic/Antipyretic treatment: ibuprofen or acetaminophen? An update]. *Thérapie* 61: 151–160.

Ossipov, M.H., Dussor, G.O., and Porreca, F. (2010). Central modulation of pain. *J. Clin. Invest.* 120: 3779–3787.

Ost, D., Roskams, T., aa, F. Van der, and De ridder Dirk (2002). Topography of the Vanilloid Receptor in the Human Bladder: More Than Just the Nerve Fibers. [Miscellaneous Article]. *J. Urol.* July 2002 168: 293–297.

Ottani, A., Leone, S., Sandrini, M., Ferrari, A., and Bertolini, A. (2006). The analgesic activity of paracetamol is prevented by the blockade of cannabinoid CB1 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 531: 280–281.

Ouellet, M., and Percival, M.D. (2001). Mechanism of Acetaminophen Inhibition of Cyclooxygenase Isoforms. *Arch. Biochem. Biophys.* 387: 273–280.

P

- Pabbidi, R.M., Yu, S.-Q., Peng, S., Khardori, R., Pauza, M.E., and Premkumar, L.S. (2008). Influence of TRPV1 on diabetes-induced alterations in thermal pain sensitivity. *Mol. Pain* 4: 9.
- Pagotto, U., Marsicano, G., Cota, D., Lutz, B., and Pasquali, R. (2006). The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr. Rev.* 27: 73–100.
- Palazzo, E., Luongo, L., Bellini, G., Guida, F., Marabese, I., Boccella, S., et al. (2012a). Changes in Cannabinoid Receptor Subtype 1 Activity and Interaction with Metabotropic Glutamate Subtype 5 Receptors in the Periaqueductal Gray-Rostral Ventromedial Medulla Pathway in a Rodent Neuropathic Pain Model. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*.
- Palazzo, E., Luongo, L., Novellis, V. de, Berrino, L., Rossi, F., and Maione, S. (2010). Moving towards supraspinal TRPV1 receptors for chronic pain relief. *Mol. Pain* 6: 66.
- Palazzo, E., Luongo, L., Novellis, V. de, Rossi, F., Marabese, I., and Maione, S. (2012b). Transient receptor potential vanilloid type 1 and pain development. *Curr. Opin. Pharmacol.*
- Palazzo, E., Marabese, I., Novellis, V. de, Oliva, P., Rossi, F., Berrino, L., et al. (2001). Metabotropic and NMDA glutamate receptors participate in the cannabinoid-induced antinociception. *Neuropharmacology* 40: 319–326.
- Palazzo, E., Marabese, I., Novellis, V. de, Rossi, F., and Maione, S. (2014). Supraspinal metabotropic glutamate receptors: a target for pain relief and beyond. *Eur. J. Neurosci.* 39: 444–454.
- Palazzo, E., Novellis, V. de, Marabese, I., Cuomo, D., Rossi, F., Berrino, L., et al. (2002). Interaction between vanilloid and glutamate receptors in the central modulation of nociception. *Eur J Pharmacol* 439: 69–75.
- Palazzo, E., Rossi, F., and Maione, S. (2008). Role of TRPV1 receptors in descending modulation of pain. *Mol. Cell. Endocrinol.* 286: S79–S83.
- Palazzos, E., Novellis, V. de, Marabese, I., Rossi, F., and Maione, S. (2006). Metabotropic glutamate and cannabinoid receptor crosstalk in periaqueductal grey pain processing. *Curr. Neuropharmacol.* 4: 225–231.
- Papadopoulos, M.C., Manley, G.T., Krishna, S., and Verkman, A.S. (2004). Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18: 1291–1293.
- Parolaro, D., Massi, P., Rubino, T., and Monti, E. (2002). Endocannabinoids in the immune system and cancer. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66: 319–332.
- Patel, M.K., Pinnock, R.D., and Lee, K. (2001). Adenosine exerts multiple effects in dorsal horn neurones of the adult rat spinal cord. *Brain Res.* 920: 19–26.
- Paxinos, G. (2004). *The Rat Nervous System* (Gulf Professional Publishing).
- Paxinos, G. (2014). *The Rat Nervous System* (Academic Press).
- Pedersen, S.F., Owsianik, G., and Nilius, B. (2005). TRP channels: an overview. *Cell Calcium* 38: 233–252.
- Pelissier, T., Alloui, A., Caussade, F., Dubray, C., Cloarec, A., Lavarenne, J., et al. (1996). Paracetamol exerts a spinal antinociceptive effect involving an indirect interaction with 5-hydroxytryptamine₃ receptors: in vivo and in vitro evidence. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278: 8–14.
- Pelissier, T., Alloui, A., Paeile, C., and Eschaliere, A. (1995). Evidence of a central antinociceptive effect of paracetamol involving spinal 5HT₃ receptors. *Neuroreport* 6: 1546–1548.
- Peng, J., and Li, Y.-J. (2010). The vanilloid receptor TRPV1: Role in cardiovascular and gastrointestinal protection. *Eur. J. Pharmacol.* 627: 1–7.

- Pertovaara, A., Wei, H., and Hämäläinen, M.M. (1996). Lidocaine in the rostroventromedial medulla and the periaqueductal gray attenuates allodynia in neuropathic rats. *Neurosci. Lett.* 218: 127–130.
- Pertwee, R.G. (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol. Ther.* 74: 129–180.
- Pertwee, R.G. (1999). Evidence for the presence of CB1 cannabinoid receptors on peripheral neurones and for the existence of neuronal non-CB1 cannabinoid receptors. *Life Sci.* 65: 597–605.
- Peterson, R.G., and Rumack, B.H. (1978). Pharmacokinetics of acetaminophen in children. *Pediatrics* 62: 877–879.
- Petrocellis, L.D., Bisogno, T., Maccarrone, M., Davis, J.B., Finazzi-Agrò, A., and Marzo, V.D. (2001). The Activity of Anandamide at Vanilloid VR1 Receptors Requires Facilitated Transport across the Cell Membrane and Is Limited by Intracellular Metabolism. *J. Biol. Chem.* 276: 12856–12863.
- Petrocellis, L. De, and Marzo, V. Di (2010). Non-CB1, non-CB2 receptors for endocannabinoids, plant cannabinoids, and synthetic cannabimimetics: focus on G-protein-coupled receptors and transient receptor potential channels. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.* 5: 103–121.
- Peyron, C., Tighe, D.K., Pol, A.N. van den, Lecea, L. de, Heller, H.C., Sutcliffe, J.G., et al. (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18: 9996–10015.
- Pickering, G., Estève, V., Lorient, M.-A., Eschalier, A., and Dubray, C. (2008). Acetaminophen reinforces descending inhibitory pain pathways. *Clin. Pharmacol. Ther.* 84: 47–51.
- Pickering, G., Lorient, M.-A., Libert, F., Eschalier, A., Beaune, P., and Dubray, C. (2006). Analgesic effect of acetaminophen in humans: first evidence of a central serotonergic mechanism. *Clin. Pharmacol. Ther.* 79: 371–378.
- Pickering, G., Macian, N., Libert, F., Cardot, J.M., Coissard, S., Perovitch, P., et al. (2014). Buccal acetaminophen provides fast analgesia: two randomized clinical trials in healthy volunteers. *Drug Des. Devel. Ther.* 8: 1621–1627.
- Pickering, G., Moustafa, F., Desbrandes, S., Cardot, J.M., Roux, D., and Dubray, C. (2013). Paracetamol and opioid pathways: a pilot randomized clinical trial. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 27: 339–345.
- Pierce, C.A., and Voss, B. (2010). Efficacy and Safety of Ibuprofen and Acetaminophen in Children and Adults: A Meta-Analysis and Qualitative Review. *Ann. Pharmacother.* 44: 489–506.
- Pinardi, G., Sierralta, F., and Miranda, H.F. (2003). Atropine reverses the antinociception of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the tail-flick test of mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 74: 603–608.
- Pini, L.A., Sandrini, M., and Vitale, G. (1996). The antinociceptive action of paracetamol is associated with changes in the serotonergic system in the rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 308: 31–40.
- Pini, L.A., Vitale, G., Ottani, A., and Sandrini, M. (1997). Naloxone-Reversible Antinociception by Paracetamol in the Rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280: 934–940.
- Pinto-Ribeiro, F., Amorim, D., David-Pereira, A., Monteiro, A.M., Costa, P., Pertovaara, A., et al. (2013). Pronociception from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus is mediated by the rostral ventromedial medulla in healthy controls but is absent in arthritic animals. *Brain Res. Bull.* 99: 100–108.
- Pistis, M., Ferraro, L., Pira, L., Flore, G., Tanganelli, S., Gessa, G.L., et al. (2002). Delta(9)-tetrahydrocannabinol decreases extracellular GABA and increases extracellular glutamate and dopamine levels in the rat prefrontal cortex: an in vivo microdialysis study. *Brain Res.* 948: 155–158.
- Ploner, M., Lee, M.C., Wiech, K., Bingel, U., and Tracey, I. (2010). Prestimulus functional connectivity determines pain perception in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107: 355–360.
- Prescott, L.F. (1980). Kinetics and metabolism of paracetamol and phenacetin. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 10 Suppl 2: 291S–298S.

Prescott, L.F. (2000a). Paracetamol, alcohol and the liver. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 49: 291–301.

Prescott, L.F. (2000b). Therapeutic misadventure with paracetamol: fact or fiction? *Am. J. Ther.* 7: 99–114.

Prior, M.J., Codispoti, J.R., and Fu, M. (2010). A randomized, placebo-controlled trial of acetaminophen for treatment of migraine headache. *Headache* 50: 819–833.

Proudnikov, D., Kroslak, T., Sipe, J.C., Randesi, M., Li, D., Hamon, S., et al. (2010). Association of polymorphisms of the cannabinoid receptor (CNR1) and fatty acid amide hydrolase (FAAH) genes with heroin addiction: impact of long repeats of CNR1. *Pharmacogenomics J.* 10: 232–242.

Pytliak, M., Vargová, V., Mechírová, V., and Felšöci, M. (2011). Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 60: 15–25.

Q

Queneau, P. (2006). La saga du paracétamol. *Médecine* 2: 158–159.

R

Raffa, R.B., and Codd, E.E. (1996). Lack of binding of acetaminophen to 5-HT receptor or uptake sites (or eleven other binding/uptake assays). *Life Sci.* 59: PL37–PL40.

Raffa, R.B., Stone, D.J., and Tallarida, R.J. (2000). Discovery of 'Self-Synergistic' Spinal/Supraspinal Antinociception Produced by Acetaminophen (Paracetamol). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295: 291–294.

Raffa, R.B., Walker, E.A., and Sterious, S.N. (2004). Opioid receptors and acetaminophen (paracetamol). *Eur. J. Pharmacol.* 503: 209–210.

Rahman, W., Bannister, K., Bee, L.A., and Dickenson, A.H. (2011). A pronociceptive role for the 5-HT₂ receptor on spinal nociceptive transmission: an in vivo electrophysiological study in the rat. *Brain Res.* 1382: 29–36.

Rahman, W., Suzuki, R., Webber, M., Hunt, S.P., and Dickenson, A.H. (2006). Depletion of endogenous spinal 5-HT attenuates the behavioural hypersensitivity to mechanical and cooling stimuli induced by spinal nerve ligation. *PAIN* 123: 264–274.

Rana, G. La, Russo, R., Campolongo, P., Bortolato, M., Mangieri, R.A., Cuomo, V., et al. (2006). Modulation of neuropathic and inflammatory pain by the endocannabinoid transport inhibitor AM404 [N-(4-hydroxyphenyl)-eicosa-5,8,11,14-tetraamide]. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317: 1365–1371.

Rapport, M.M., Green, A.A., and Page, I.H. (1947). Purification of the substance which is responsible for the vasoconstrictor activity of serum. *Fed. Proc.* 6: 184.

Rapport, M.M., Green, A.A., and Page, I.H. (1948). Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 176: 1243–1251.

Rashid, M.H., Inoue, M., Kondo, S., Kawashima, T., Bakoshi, S., and Ueda, H. (2003). Novel Expression of Vanilloid Receptor 1 on Capsaicin-Insensitive Fibers Accounts for the Analgesic Effect of Capsaicin Cream in Neuropathic Pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304: 940–948.

Rawlins, M.D., Henderson, D.B., and Hijab, A.R. (1977). Pharmacokinetics of paracetamol (acetaminophen) after intravenous and oral administration. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 11: 283–286.

Rawls, S.M., Ding, Z., and Cowan, A. (2006). Role of TRPV1 and cannabinoid CB1 receptors in AM 404-evoked hypothermia in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 83: 508–516.

Rea, K., Roche, M., and Finn, D.P. (2007). Supraspinal modulation of pain by cannabinoids: the role of GABA and glutamate. *Br. J. Pharmacol.* 152: 633–648.

Reisenberg, M., Singh, P.K., Williams, G., and Doherty, P. (2012). The diacylglycerol lipases:

- structure, regulation and roles in and beyond endocannabinoid signalling. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 367: 3264–3275.
- Renner, B., Clarke, G., Grattan, T., Beisel, A., Mueller, C., Werner, U., et al. (2007). Caffeine accelerates absorption and enhances the analgesic effect of acetaminophen. *J. Clin. Pharmacol.* 47: 715–726.
- Renno, W.M., Mullett, M.A., and Beitz, A.J. (1992). Systemic morphine reduces GABA release in the lateral but not the medial portion of the midbrain periaqueductal gray of the rat. *Brain Res.* 594: 221–232.
- Resstel, L.B.M., Lisboa, S.F., Aguiar, D.C., Corrêa, F.M.A., and Guimarães, F.S. (2008). Activation of CB1 cannabinoid receptors in the dorsolateral periaqueductal gray reduces the expression of contextual fear conditioning in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 198: 405–411.
- Reynolds, D.V. (1969). Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science* 164: 444–445.
- Rezende, R.M., França, D.S., Menezes, G.B., Reis, W.G.P. dos, Bakhle, Y.S., and Francischi, J.N. (2008). Different mechanisms underlie the analgesic actions of paracetamol and dipyron in a rat model of inflammatory pain. *Br. J. Pharmacol.* 153: 760–768.
- Rice, A.S.C., Cimino-Brown, D., Eisenach, J.C., Kontinen, V.K., Lacroix-Fralish, M.L., Machin, I., et al. (2008a). 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.
- Rice, A.S.C., Cimino-Brown, D., Eisenach, J.C., Kontinen, V.K., Lacroix-Fralish, M.L., Machin, I., et al. (2008b). 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.
- Richardson, J.D. (2000). Cannabinoids modulate pain by multiple mechanisms of action. *J. Pain* 1: 2–14.
- Richardson, J.D., Aanonsen, L., and Hargreaves, K.M. (1998a). Hypoactivity of the spinal cannabinoid system results in NMDA-dependent hyperalgesia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18: 451–457.
- Richardson, J.D., Kilo, S., and Hargreaves, K.M. (1998b). Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors. *Pain* 75: 111–119.
- Richette, P. (2014). How safe is acetaminophen in rheumatology? *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* 81: 4–5.
- Ring, E.F., Collins, A.J., Bacon, P.A., and Cosh, J.A. (1974). Quantitation of thermography in arthritis using multi-isothermal analysis. II. Effect of nonsteroidal anti-inflammatory therapy on the thermographic index. *Ann. Rheum. Dis.* 33: 353–356.
- Rivot, J.P., Chiang, C.Y., and Besson, J.M. (1982). Increase of serotonin metabolism within the dorsal horn of the spinal cord during nucleus raphe magnus stimulation, as revealed by in vivo electrochemical detection. *Brain Res.* 238: 117–126.
- Robak, J., Wieckowski, A., and Gryglewski, R. (1978). The effect of 4-acetamidophenol on prostaglandin synthetase activity in bovine and ram seminal vesicle microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 27: 393–396.
- Robbins, N., Koch, S.E., and Rubinstein, J. (2013). Targeting TRPV1 and TRPV2 for potential therapeutic interventions in cardiovascular disease. *Transl. Res.* 161: 469–476.
- Roberts, E., Nunes, V.D., Buckner, S., Latchem, S., Constanti, M., Miller, P., et al. (2015). Paracetamol: not as safe as we thought? A systematic literature review of observational studies. *Ann. Rheum. Dis.* annrheumdis–2014–206914.
- Roberts, J.C., Davis, J.B., and Benham, C.D. (2004). [3H]Resiniferatoxin autoradiography in the CNS of wild-type and TRPV1 null mice defines TRPV1 (VR-1) protein distribution. *Brain Res.* 995: 176–183.
- Robinson, L., McKillop-Smith, S., Ross, N.L., Pertwee, R.G., Hampson, R.E., Platt, B., et al. (2008). Hippocampal endocannabinoids inhibit spatial learning and limit spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 198: 551–563.
- Romanovsky, A.A., Almeida, M.C., Garami, A., Steiner, A.A., Norman, M.H., Morrison, S.F., et al. (2009). The Transient Receptor Potential Vanilloid-1 Channel in Thermoregulation: A Thermosensor It Is Not. *Pharmacol. Rev.* 61: 228–261.

- Rosén, A., Zhang, Y.-X., Lund, I., Lundeberg, T., and Yu, L.-C. (2004). Substance P microinjected into the periaqueductal gray matter induces antinociception and is released following morphine administration. *Brain Res.* 1001: 87–94.
- Ross, R.A. (2003). Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br. J. Pharmacol.* 140: 790–801.
- Rot, M., van den Heuvel, M., Mathew, S.J., and Charney, D.S. (2009). Neurobiological mechanisms in major depressive disorder. *CMAJ Can. Med. Assoc. J.* 180: 305–313.
- Ruggieri, V., Vitale, G., Pini, L., and Sandrini, M. (2008). Differential involvement of opioidergic and serotonergic systems in the antinociceptive activity of N-arachidonoyl-phenolamine (AM404) in the rat: comparison with paracetamol. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 377: 219–229.
- Rumack, B.H. (1983). Acetaminophen overdose. *Am. J. Med.* 75: 104–112.
- Russo, E.B. (2013). Cannabis and Cannabinoids: Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential (Routledge).
- Rygnestad, T., Zahlén, K., and Samdal, F.A. (2000). Absorption of effervescent paracetamol tablets relative to ordinary paracetamol tablets in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 56: 141–143.
- S
- Sařaga, M., Sobczak, M., and Fichna, J. (2014). Inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH) as a novel therapeutic strategy in the treatment of pain and inflammatory diseases in the gastrointestinal tract. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 52: 173–179.
- Sasso, O., Bertorelli, R., Bandiera, T., Scarpelli, R., Colombano, G., Armirotti, A., et al. (2012). Peripheral FAAH inhibition causes profound antinociception and protects against indomethacin-induced gastric lesions. *Pharmacol. Res.* 65: 553–563.
- Savigny, P., Watson, P., Underwood, M., and Guideline Development Group (2009). Early management of persistent non-specific low back pain: summary of NICE guidance. *BMJ* 338: b1805.
- Sawynok, J. (2011a). Caffeine and pain. *PAIN* 152: 726–729.
- Sawynok, J. (2011b). Methylxanthines and Pain. In *Methylxanthines*, (Springer Berlin Heidelberg), pp 311–329.
- Sawynok, J., and Liu, X.J. (2003). Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Prog. Neurobiol.* 69: 313–340.
- Sawynok, J., and Reid, A.R. (2012). Caffeine inhibits antinociception by acetaminophen in the formalin test by inhibiting spinal adenosine A1 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 674: 248–254.
- Scanlon, G.C., Wallace, M.S., Ispirescu, J.S., and Schulteis, G. (2006). Intradermal capsaicin causes dose-dependent pain, allodynia, and hyperalgesia in humans. *J. Investig. Med. Off. Publ. Am. Fed. Clin. Res.* 54: 238–244.
- Schildknecht, S., Bachschmid, M., and Ullrich, V. (2005). Peroxynitrite provides the peroxide tone for PGHS-2-dependent prostacyclin synthesis in vascular smooth muscle cells. *FASEB J.*
- Schildknecht, S., Daiber, A., Ghisla, S., Cohen, R.A., and Bachschmid, M.M. (2008). Acetaminophen inhibits prostanoid synthesis by scavenging the PGHS-activator peroxynitrite. *FASEB J.* 22: 215–224.
- Schlosburg, J.E., Kinsey, S.G., and Lichtman, A.H. (2009). Targeting fatty acid amide hydrolase (FAAH) to treat pain and inflammation. *AAPS J.* 11: 39–44.
- Schmid, P.C., Paria, B.C., Krebsbach, R.J., Schmid, H.H.O., and Dey, S.K. (1997). Changes in anandamide levels in mouse uterus are associated with uterine receptivity for embryo implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 4188–4192.
- Schnell, S.A., Staines, W.A., and Wessendorf, M.W. (1999). Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 47: 719–730.

- Schultz, S.T., Klonoff-Cohen, H.S., Wingard, D.L., Akshoomoff, N.A., Macera, C.A., and Ji, M. (2008). Acetaminophen (paracetamol) use, measles-mumps-rubella vaccination, and autistic disorder: the results of a parent survey. *Autism Int. J. Res. Pract.* 12: 293–307.
- Scotland, R.S., Chauhan, S., Davis, C., Felipe, C.D., Hunt, S., Kabir, J., et al. (2004). Vanilloid Receptor TRPV1, Sensory C-Fibers, and Vascular Autoregulation A Novel Mechanism Involved in Myogenic Constriction. *Circ. Res.* 95: 1027–1034.
- Sexton, A., McDonald, M., Cayla, C., Thiemermann, C., and Ahluwalia, A. (2007). 12-Lipoxygenase-derived eicosanoids protect against myocardial ischemia/reperfusion injury via activation of neuronal TRPV1. *FASEB J.* 21: 2695–2703.
- Seyrek, M., Kahraman, S., Deveci, M.S., Yesilyurt, O., and Dogrul, A. (2010). Systemic cannabinoids produce CB₁-mediated antinociception by activation of descending serotonergic pathways that act upon spinal 5-HT(7) and 5-HT(2A) receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 649: 183–194.
- Shaftel, S.S., Olschowka, J.A., Hurley, S.D., Moore, A.H., and O'Banion, M.K. (2003). COX-3: a splice variant of cyclooxygenase-1 in mouse neural tissue and cells. *Mol. Brain Res.* 119: 213–215.
- Shaheen, S.O., Sterne, J.A.C., Songhurst, C.E., and Burney, P.G.J. (2000). Frequent paracetamol use and asthma in adults. *Thorax* 55: 266–270.
- Sheth, S., Brito, R., Mukherjea, D., Rybak, L.P., and Ramkumar, V. (2014). Adenosine Receptors: Expression, Function and Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 15: 2024–2052.
- Siegers, C.P. (1973). Effects of caffeine on the absorption and analgesic efficacy of paracetamol in rats. *Pharmacology* 10: 19–27.
- Simonnet, A., Cador, M., and Caille, S. (2013). Nicotine reinforcement is reduced by cannabinoid CB1 receptor blockade in the ventral tegmental area. *Addict. Biol.* 18: 930–936.
- Smith, H.S. (2009a). Potential analgesic mechanisms of acetaminophen. *Pain Physician* 12: 269–280.
- Smith, H.S. (2009b). Potential analgesic mechanisms of acetaminophen. *Pain Physician* 12: 269–80.
- Smith, W.L., Garavito, R.M., and DeWitt, D.L. (1996). Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 271: 33157–33160.
- Snijder, C.A., Kortenkamp, A., Steegers, E.A.P., Jaddoe, V.W.V., Hofman, A., Hass, U., et al. (2012). Intrauterine exposure to mild analgesics during pregnancy and the occurrence of cryptorchidism and hypospadias in the offspring: the Generation R Study. *Hum. Reprod.* 27: 1191–1201.
- Snipes, J.A., Kis, B., Shelness, G.S., Hewett, J.A., and Busija, D.W. (2005). Cloning and characterization of cyclooxygenase-1b (putative cyclooxygenase-3) in rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313: 668–676.
- Sommer, C. (2004). Serotonin in pain and analgesia. *Mol. Neurobiol.* 30: 117–125.
- Soukupová, M., Palazzo, E., Chiaro, M. De, Gatta, L., Migliozi, A.L., Guida, F., et al. (2010). Effects of URB597, an inhibitor of fatty acid amide hydrolase (FAAH), on analgesic activity of paracetamol. *Neuro Endocrinol. Lett.* 31: 507–511.
- Sounvoravong, S., Nakashima, M.N., Wada, M., and Nakashima, K. (2004). Decrease in serotonin concentration in raphe magnus nucleus and attenuation of morphine analgesia in two mice models of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 484: 217–223.
- Southall, M.D., Li, T., Gharibova, L.S., Pei, Y., Nicol, G.D., and Travers, J.B. (2003). Activation of Epidermal Vanilloid Receptor-1 Induces Release of Proinflammatory Mediators in Human Keratinocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304: 217–222.
- Spiller, R., Aziz, Q., Creed, F., Emmanuel, A., Houghton, L., Hungin, P., et al. (2007). Guidelines on the irritable bowel syndrome: mechanisms and practical management. *Gut* 56: 1770–1798.
- Stamford, J.A. (1995). Descending control of pain. *Br. J. Anaesth.* 75: 217–227.
- Starowicz, K., Maione, S., Cristino, L., Palazzo, E., Marabese, I., Rossi, F., et al. (2007). Tonic Endovanilloid Facilitation of Glutamate Release in

T

Brainstem Descending Antinociceptive Pathways. *J. Neurosci.* 27: 13739–13749.

Steenland, H.W., Ko, S.W., Wu, L.-J., and Zhuo, M. (2006). Hot receptors in the brain. *Mol. Pain* 2: 34.

Stevens, L.T., and Lee (1884). Action of intermittent pressure and of defibrinated blood upon blood vessels of frog and terrapin. *Johns Hopkins Biol Stud.* 99.

Story, G.M. (2006). The Emerging Role of TRP Channels in Mechanisms of Temperature and Pain Sensation. *Curr. Neuropharmacol.* 4: 183.

Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., et al. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215: 89–97.

Suplita, R.L., Farthing, J.N., Gutierrez, T., and Hohmann, A.G. (2005). Inhibition of fatty-acid amide hydrolase enhances cannabinoid stress-induced analgesia: sites of action in the dorsolateral periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. *Neuropharmacology* 49: 1201–1209.

al-Swayeh, O.A., Futter, L.E., Clifford, R.H., and Moore, P.K. (2000). Nitroparacetamol exhibits anti-inflammatory and anti-nociceptive activity. *Br. J. Pharmacol.* 130: 1453–1456.

Swierkosz, T.A., Jordan, L., McBride, M., McGough, K., Devlin, J., and Botting, R.M. (2002). Actions of paracetamol on cyclooxygenases in tissue and cell homogenates of mouse and rabbit. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 8: BR496–503.

Szallasi, A., and Blumberg, P.M. (1999). Vanilloid (Capsaicin) Receptors and Mechanisms. *Pharmacol. Rev.* 51: 159–212.

Szallasi, A., Cortright, D.N., Blum, C.A., and Eid, S.R. (2007). The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6: 357–372.

Takahashi, Y., Hashimoto, K., and Tsuji, S. (2004). Successful use of zonisamide for central poststroke pain. *J. Pain* 5: 192–194.

Takemura, M., Quarcoo, D., Niimi, A., Dinh, Q.T., Geppetti, P., Fischer, A., et al. (2008). Is TRPV1 a useful target in respiratory diseases? *Pulm. Pharmacol. Ther.* 21: 833–839.

Talley, E.M., Cribbs, L.L., Lee, J.-H., Daud, A., Perez-Reyes, E., and Bayliss, D.A. (1999). Differential Distribution of Three Members of a Gene Family Encoding Low Voltage-Activated (T-Type) Calcium Channels. *J. Neurosci.* 19: 1895–1911.

Tamamaki, N., Yanagawa, Y., Tomioka, R., Miyazaki, J.-I., Obata, K., and Kaneko, T. (2003). Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J. Comp. Neurol.* 467: 60–79.

Tasmacioglu, B., Aydinli, I., Keskinbora, K., Pekel, A.F., Salihoglu, T., and Sonsuz, A. (2009). Effect of intravenous administration of paracetamol on morphine consumption in cancer pain control. *Support. Care Cancer Off. J. Multinat. Assoc. Support. Care Cancer* 17: 1475–1481.

Tavares, C., and Sakata, R.K. (2012). Caffeine in the treatment of pain. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 62: 387–401.

Temple, A.R., Temple, B.R., and Kuffner, E.K. (2013). Dosing and antipyretic efficacy of oral acetaminophen in children. *Clin. Ther.* 35: 1361–1375.e1–45.

Tiippana, E., Hamunen, K., Kontinen, V., and Kalso, E. (2013). The effect of paracetamol and tropisetron on pain: experimental studies and a review of published data. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 112: 124–131.

Tittelboom, T. Van, and Govaerts-Lepicard, M. (1989). Hypothermia: an unusual side effect of paracetamol. *Vet. Hum. Toxicol.* 31: 57–59.

Tjølsen, A., Lund, A., and Hole, K. (1991). Antinociceptive effect of paracetamol in rats is partly dependent on spinal serotonergic systems. *Eur. J. Pharmacol.* *193*: 193–201.

Tjølsen, A., Lund, A., and Hole, K. (1991). Antinociceptive effect of paracetamol in rats is partly dependent on spinal serotonergic systems. *Eur J Pharmacol* *193*: 193–201.

Tominaga, M., and Caterina, M.J. (2004). Thermosensation and pain. *J. Neurobiol.* *61*: 3–12.

Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., et al. (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* *21*: 531–543.

Toms, L., McQuay, H.J., Derry, S., and Moore, R.A. (2008). Single dose oral paracetamol (acetaminophen) for postoperative pain in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD004602.

Tóth, A., Boczán, J., Kedei, N., Lizanecz, E., Bagi, Z., Papp, Z., et al. (2005). Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Mol. Brain Res.* *135*: 162–168.

Toussaint, K., Yang, X.C., Zielinski, M.A., Reigle, K.L., Sacavage, S.D., Nagar, S., et al. (2010). What do we (not) know about how paracetamol (acetaminophen) works? *J. Clin. Pharm. Ther.* *35*: 617–638.

Towheed, T.E., Maxwell, L., Judd, M.G., Catton, M., Hochberg, M.C., and Wells, G. (2006). Acetaminophen for osteoarthritis. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD004257.

Tsatsanis, C., Androulidaki, A., Venihaki, M., and Margioris, A.N. (2006). Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *38*: 1654–1661.

Tsou, K., Brown, S., Sañudo-Peña, M.C., Mackie, K., and Walker, J.M. (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* *83*: 393–411.

Tzortzopoulou, A., McNicol, E.D., Cepeda, M.S., Francia, M.B.D., Farhat, T., and Schumann, R. (1996). Single dose intravenous propacetamol or intravenous paracetamol for postoperative pain. In

Cochrane Database of Systematic Reviews, (John Wiley & Sons, Ltd),.

U

Ulugol, A. (2014). The Endocannabinoid System as a Potential Therapeutic Target for Pain Modulation. *Balk. Med. J.* *31*: 115–120.

Umathe, S.N., Manna, S.S.S., Utturwar, K.S., and Jain, N.S. (2009). Endocannabinoids mediate anxiolytic-like effect of acetaminophen via CB1 receptors. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* *33*: 1191–1199.

V

Vandevoorde, S., and Fowler, C.J. (2005). Inhibition of fatty acid amide hydrolase and monoacylglycerol lipase by the anandamide uptake inhibitor VDM11: evidence that VDM11 acts as an FAAH substrate. *Br. J. Pharmacol.* *145*: 885–893.

Vanegas, H., and Schaible, H.-G. (2004). Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Res. Rev.* *46*: 295–309.

Vanegas, H., Vazquez, E., and Tortorici, V. (2010). NSAIDs, Opioids, Cannabinoids and the Control of Pain by the Central Nervous System. *Pharmaceuticals* *3*: 1335–1347.

Vane, J.R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature. New Biol.* *231*: 232–235.

Vane, J.R., and Botting, R.M. (1998). Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am. J. Med.* *104*: 2S–8S; discussion 21S–22S.

Vane, J.R., Mitchell, J.A., Appleton, I., Tomlinson, A., Bishop-Bailey, D., Croxtall, J., et al. (1994). Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*: 2046.

- Vialli, D.M., and Erspamer, V. (1933). Cellule enterocromaffini e cellule basigranulose acidofile nei Vertebrati. *Z. Für Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 19: 743–773.
- Viana, M.B., Graeff, F.G., and Löschmann, P.-A. (1997). Kainate Microinjection into the Dorsal Raphe Nucleus Induces 5-HT Release in the Amygdala and Periaqueductal Gray. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 58: 167–172.
- Von Mering J. (1893). Beitrage zur Kenntniss der Antipyretica. *Ther Monatsch* 577–587.
- ## W
- Walker, J.M., and Huang, S.M. (2002). Cannabinoid analgesia. *Pharmacol. Ther.* 95: 127–135.
- Walker, J.M., Huang, S.M., Strangman, N.M., Tsou, K., and Sañudo-Peña, M.C. (1999). Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 12198–12203.
- Walker, J.M., Krey, J.F., Chu, C.J., and Huang, S.M. (2002). Endocannabinoids and related fatty acid derivatives in pain modulation. *Chem. Phys. Lipids* 121: 159–172.
- Walker, J.M., Strangman, N.M., and Huang, S.M. (2001). Cannabinoids and pain. *Pain Res. Manag. J. Can. Pain Soc. J. Société Can. Pour Trait. Douleur* 6: 74–79.
- Wang, H., and Wessendorf, M.W. (2002). Mu- and delta-opioid receptor mRNAs are expressed in periaqueductal gray neurons projecting to the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience* 109: 619–634.
- Ward, S.M., Bayguinov, J., Won, K.-J., Grundy, D., and Berthoud, H.R. (2003). Distribution of the vanilloid receptor (VR1) in the gastrointestinal tract. *J. Comp. Neurol.* 465: 121–135.
- Warner, T.D., Giuliano, F., Vojnovic, I., Bukasa, A., Mitchell, J.A., and Vane, J.R. (1999). Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: A full in vitro analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 7563.
- Warner, T.D., and Mitchell, J.A. (2004). Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18: 790–804.
- Warner, T.D., Vojnovic, I., Giuliano, F., Jiménez, R., Bishop-Bailey, D., and Mitchell, J.A. (2004). Cyclooxygenases 1, 2, and 3 and the Production of Prostaglandin I₂: Investigating the Activities of Acetaminophen and Cyclooxygenase-2-Selective Inhibitors in Rat Tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310: 642–647.
- Watanabe, N., Horie, S., Michael, G.J., Keir, S., Spina, D., Page, C.P., et al. (2006). Immunohistochemical co-localization of transient receptor potential vanilloid (TRPV)1 and sensory neuropeptides in the guinea-pig respiratory system. *Neuroscience* 141: 1533–1543.
- Wegman, A., Windt, D. van der, Tulder, M. van, Stalman, W., and Vries, T. de (2004). Nonsteroidal antiinflammatory drugs or acetaminophen for osteoarthritis of the hip or knee? A systematic review of evidence and guidelines. *J. Rheumatol.* 31: 344–354.
- Wei, F., Dubner, R., Zou, S., Ren, K., Bai, G., Wei, D., et al. (2010). Molecular Depletion of Descending Serotonin Unmasks Its Novel Facilitatory Role in the Development of Persistent Pain. *J. Neurosci.* 30: 8624–8636.
- Wei, H., Saarnilehto, M., Falck, L., Viisanen, H., Lasierra, M., Koivisto, A., et al. (2013). Spinal transient receptor potential ankyrin 1 channel induces mechanical hypersensitivity, increases cutaneous blood flow, and mediates the pronociceptive action of dynorphin A. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* 64: 331–340.
- Weil, K., Hooper, L., Afzal, Z., Esposito, M., Worthington, H.V., Wijk, A.J. van, et al. (2007). Paracetamol for pain relief after surgical removal of lower wisdom teeth. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD004487.
- Westlund, K., Veraportocarrero, L., Zhang, L., Wei, J., Quast, M., and Cleeland, C. (2009). fMRI of supraspinal areas after morphine and one week

pancreatic inflammation in rats. *NeuroImage* 44: 23–34.

Wienecke, T., and Gøtzsche, P.C. (1996). Paracetamol versus nonsteroidal anti-inflammatory drugs for rheumatoid arthritis. In *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (John Wiley & Sons, Ltd),.

Williams, C.M., Maher, C.G., Latimer, J., McLachlan, A.J., Hancock, M.J., Day, R.O., et al. (2014). Efficacy of paracetamol for acute low-back pain: a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*.

Williams, F.G., and Beitz, A.J. (1990). Ultrastructural morphometric analysis of GABA-immunoreactive terminals in the ventrocaudal periaqueductal grey: analysis of the relationship of GABA terminals and the GABAA receptor to periaqueductal grey-raphe magnus projection neurons. *J. Neurocytol.* 19: 686–696.

Wilsey, B., Marcotte, T., Deutsch, R., Gouaux, B., Sakai, S., and Donaghe, H. (2013). Low-dose vaporized cannabis significantly improves neuropathic pain. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* 14: 136–148.

Wilson-Poe, A.R., Lau, B.K., and Vaughan, C.W. (2014). Repeated morphine treatment alters cannabinoid modulation of GABAergic synaptic transmission within the rat periaqueductal grey. *Br. J. Pharmacol.*

Wilson-Poe, A.R., Mitchell, V.A., and Vaughan, C.W. (2013). Postsynaptic mGluR mediated excitation of neurons in midbrain periaqueductal grey. *Neuropharmacology* 66: 348–354.

Wilson-Poe, A.R., Morgan, M.M., Aicher, S.A., and Hegarty, D.M. (2012). Distribution of CB1 cannabinoid receptors and their relationship with mu-opioid receptors in the rat periaqueductal gray. *Neuroscience*.

Winkler, C.W., Hermes, S.M., Chavkin, C.I., Drake, C.T., Morrison, S.F., and Aicher, S.A. (2006). Kappa opioid receptor (KOR) and GAD67 immunoreactivity are found in OFF and NEUTRAL cells in the rostral ventromedial medulla. *J. Neurophysiol.* 96: 3465–3473.

Wiskerke, J., Irimia, C., Cravatt, B.F., Vries, T.J. De, Schoffelmeer, A.N.M., Pattij, T., et al. (2012).

Characterization of the effects of reuptake and hydrolysis inhibition on interstitial endocannabinoid levels in the brain: an in vivo microdialysis study. *ACS Chem. Neurosci.* 3: 407–417.

Woolf, N.J., Harrison, J.B., and Buchwald, J.S. (1990). Cholinergic neurons of the feline pontomesencephalon. II. Ascending anatomical projections. *Brain Res.* 520: 55–72.

Wu, Z.-Z., Chen, S.-R., and Pan, H.-L. (2005). Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 Activation Down-regulates Voltage-gated Calcium Channels through Calcium-dependent Calcineurin in Sensory Neurons. *J. Biol. Chem.* 280: 18142–18151.

X

Xing, J., and Li, J. (2007). TRPV1 receptor mediates glutamatergic synaptic input to dorsolateral periaqueductal gray (dl-PAG) neurons. *J. Neurophysiol.* 97: 503–511.

Y

Yaksh, T.L. (1979). Direct evidence that spinal serotonin and noradrenaline terminals mediate the spinal antinociceptive effects of morphine in the periaqueductal gray. *Brain Res.* 160: 180–185.

Yaksh, T.L., and Tyce, G.M. (1979). Microinjection of morphine into the periaqueductal gray evokes the release of serotonin from spinal cord. *Brain Res.* 171: 176–181.

Yamagata, K., Andreasson, K.I., Kaufmann, W.E., Barnes, C.A., and Worley, P.F. (1993). Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: Regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 11: 371–386.

Yang, J., Bae, H.B., Ki, H.G., Oh, J.M., Kim, W.M., Lee, H.G., et al. (2014). Different role of spinal 5-HT(hydroxytryptamine)7 receptors and descending serotonergic modulation in inflammatory pain

induced in formalin and carrageenan rat models. *Br. J. Anaesth.* 113: 138–147.

Yiangou, Y., Facer, P., Dyer, N., Chan, C., Knowles, C., Williams, N., et al. (2001). Vanilloid receptor 1 immunoreactivity in inflamed human bowel. *The Lancet* 357: 1338–1339.

Yiangou, Y., Facer, P., Ford, A., Brady, C., Wiseman, O., Fowler, C.J., et al. (2002). Capsaicin receptor VR1 and ATP-gated ion channel P2X3 in human urinary bladder: VR1 and P2X3 IN HUMAN URINARY BLADDER. *BJU Int.* 87: 774–779.

Young, R.F., and Chambi, V.I. (1987). Pain relief by electrical stimulation of the periaqueductal and periventricular gray matter. Evidence for a non-opioid mechanism. *J. Neurosurg.* 66: 364–371.

Yu, L., Yang, F., Luo, H., Liu, F.-Y., Han, J.-S., Xing, G.-G., et al. (2008). The role of TRPV1 in different subtypes of dorsal root ganglion neurons in rat chronic inflammatory nociception induced by complete Freund's adjuvant. *Mol. Pain* 4: 61.

Z

Zaitone, S.A., El-Wakeil, A.F., and Abou-El-Ela, S.H. (2012). Inhibition of fatty acid amide hydrolase by URB597 attenuates the anxiolytic-like effect of acetaminophen in the mouse elevated plus-maze test: *Behav. Pharmacol.* 23: 417–425.

Zambraski, E.J. (1995). The effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on renal function: experimental studies in animals. *Semin. Nephrol.* 15: 205–213.

Zeitz, K.P., Guy, N., Malmberg, A.B., Dirajlal, S., Martin, W.J., Sun, L., et al. (2002). The 5-HT3 Subtype of Serotonin Receptor Contributes to Nociceptive Processing via a Novel Subset of Myelinated and Unmyelinated Nociceptors. *J. Neurosci.* 22: 1010–1019.

Zhang, W., Jones, A., and Doherty, M. (2004). Does paracetamol (acetaminophen) reduce the pain of osteoarthritis?: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Ann. Rheum. Dis.* 63: 901–907.

Zhang, W., Liu, Y., Zhao, X., Gu, X., and Ma, Z. (2014). The effect of intrathecal administration TRPA1 antagonists in a rat model of neuropathic pain. *Anesth. Analg.* 119: 179–185.

Zhang, Y., Yang, Z., Gao, X., and Wu, G. (2001). The role of 5-hydroxytryptamine1A and 5-hydroxytryptamine1B receptors in modulating spinal nociceptive transmission in normal and carrageenan-injected rats. *Pain* 92: 201–211.

Zhao, L., and Pickering, G. (2011). Paracetamol metabolism and related genetic differences. *Drug Metab. Rev.* 43: 41–52.

Zhao, Z.-Q. (2008). Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. *Prog. Neurobiol.* 85: 355–375.

Zhao, Z.-Q., Chiechio, S., Sun, Y.-G., Zhang, K.-H., Zhao, C.-S., Scott, M., et al. (2007). Mice Lacking Central Serotonergic Neurons Show Enhanced Inflammatory Pain and an Impaired Analgesic Response to Antidepressant Drugs. *J. Neurosci.* 27: 6045–6053.

Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16: 109–110.

Zygmunt, P.M., Chuang, H., Movahed, P., Julius, D., and Högestätt, E.D. (2000). The anandamide transport inhibitor AM404 activates vanilloid receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 396: 39–42.

Zygmunt, P.M., Ermund, A., Movahed, P., Andersson, D.A., Simonsen, C., Jönsson, B.A.G., et al. (2013). Monoacylglycerols Activate TRPV1 – A Link between Phospholipase C and TRPV1. *PLoS ONE* 8: e81618.

Zygmunt, P.M., Petersson, J., Andersson, D.A., Chuang, H., Sørgård, M., Marzo, V.D., et al. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400: 452–457.