



HAL
open science

Interaction entre la douleur viscérale et la douleur pariétale chez le rat et effet des anesthésiques locaux sur chacune de ces deux composantes

Toni Kfoury

► **To cite this version:**

Toni Kfoury. Interaction entre la douleur viscérale et la douleur pariétale chez le rat et effet des anesthésiques locaux sur chacune de ces deux composantes. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2015. Français. NNT : 2015SACLS107 . tel-03020642

HAL Id: tel-03020642

<https://theses.hal.science/tel-03020642>

Submitted on 24 Nov 2020

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.

NNT : 2015SACLS107

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
Préparée à « l'INSERM UMR 1195,
Faculté de Médecine Paris-Saclay »

Ecole Doctorale N°568
Signalisations et Réseaux Intégratifs en Biologie
(BIOSIGNE)

Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie et de la Santé

Par
Monsieur Toni KFOURY

Interaction entre la douleur viscérale et la douleur
pariétale chez le rat et effet des anesthésiques locaux
sur chacune de ces deux composantes

Thèse présentée et soutenue à la Faculté de Médecine Paris-
Saclay, le 23 Novembre 2015 devant le jury composé de :

Professeur Karine NOUETTE-GAULAIN	Rapporteur
Professeur Pierrick POISBEAU	Rapporteur
Professeur Hervé DANIEL	Président
Professeur Dan BENHAMOU	Examineur
Professeur Hélène BELOEIL	Examineur
Docteur Jean-Xavier MAZOIT	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Avant tout je tiens à remercier ma famille et mes amis proches pour leur soutien permanent tout au long de ce parcours.

Merci à la femme de ma vie « ma Touti » qui a su être patiente pendant ces longues années de thèse. Sans ton soutien et tes encouragements je ne suis pas sûr d'avoir pu tenir jusqu'au bout. Il me faut plus qu'une thèse pour t'exprimer tout ce que je ressens envers toi. Tu es ma fierté, ma vie et ma raison de vivre.

A nos trois loulous : Marie-José, Chloé et Alexandre qui ont changé notre vie. Je n'ai pas été très présent ces derniers mois mais c'était pour la bonne raison : finir ma thèse.

A mes parents qui ont toujours été présents pour m'aider à me construire, à m'épanouir et à m'encourager à aller toujours plus loin; vous avez su me montrer constamment votre amour et votre compréhension dont j'avais besoin pour réaliser mes projets.

Au père Amine Chahine qui nous a accompagnés depuis notre arrivée en France, qui a su parfaitement nous adopter et qui continue d'être notre principal référent dans nos décisions difficiles. Votre franchise, votre talent et votre intelligence font de vous un prêtre mais, surtout, un homme exceptionnel.

La thèse ne m'a pas seulement formé à la recherche, elle m'a également permis de rencontrer des personnes formidables.

Un merci particulier au Professeur Hélène Beloeil qui a su, malgré la distance, suivre de près le déroulement du travail en rajoutant ses conseils toujours judicieux.

Un merci du fond du cœur au Docteur Jean-François Ghersi-Egea et au Docteur Nathalie Strazielle qui ont pris le temps de me former à l'immunohistochimie. Sachez que je n'oublierai jamais ce que vous avez fait pour moi.

Que ce travail soit le fruit des connaissances que vous m'avez transmises.

Comment oublier Madame Le Guen Régine, la personne la plus agréable que j'ai pu rencontrer? Merci pour votre écoute, votre soutien et vos conseils pendant les moments critiques.

Un grand merci aux secrétaires du MAPAR Guylaine et Béatrice pour leur patience et leur compréhension.

Merci également aux étudiantes Meriem Bouchouareb et Mouna Ben Rehouma ainsi qu'à l'ingénieur d'études Leila Hamdi qui ont participé aux manipulations mais aussi à l'interprétation des résultats.

Merci à toutes les personnes qui ont participé à mon projet de thèse et qui m'ont accueilli au sein de leur département hospitalier et au sein de leur laboratoire : Monsieur le Professeur Dan Benhamou, je vous remercie infiniment pour la confiance que vous m'accordez au quotidien. J'espère être toujours à la hauteur de cette confiance.

Monsieur le Professeur Michael Schumacher, je vous remercie de votre accueil convivial au sein de l'unité INSERM que vous dirigez.

A tous ceux qui ont bien voulu diriger et accepter de juger ce travail.

Je remercie le Professeur Hervé Daniel d'avoir accepté d'être le président du jury.

Je remercie Madame le Professeur Karine Nouette-Gaulain et Monsieur le Professeur Pierrick Poisbeau d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

Je remercie aussi le Professeur Dan Benhamou et le Professeur Hélène Beloeil d'avoir accepté de juger le contenu de cette thèse.

Enfin, je tiens à exprimer ma vive reconnaissance au Docteur Jean-Xavier Mazoit, directeur de ma thèse, pour sa patience, son dévouement et sa disponibilité à mon égard. C'est grâce à lui que je me suis engagé dans cette voie scientifique. Pendant toutes ces années tu as été pour moi un exemple de perfectionnisme et de persévérance. Je te remercie de m'avoir permis de m'épanouir dans le monde

particulier et passionnant de la recherche et j'espère que mon travail sera à la hauteur de tes espérances.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	2
RESUME.....	9
ABSTRACT	10
TABLE DES ABREVIATIONS	11
LISTE DES FIGURES	13
LISTE DES TABLEAUX.....	15
TERMINOLOGIES DE L'IASP	16
I- INTRODUCTION.....	18
1. Innervation du tube digestif et du péritoine.....	22
1.1. Innervation du tube digestif.....	22
1.2. Innervation du péritoine	26
2. Nociception	28
2.1. Voies médullaires de la nociception	29
2.1.1. Projections des fibres afférentes primaires	30
2.1.2. Voie ascendante.....	32
2.1.3. Structures supraspinales impliquées dans la nociception.....	35
2.2. Le nerf vague et son rôle dans la transmission de la nociception.....	36
2.2.1. Anatomie du nerf vague	36
2.2.2. Rôle du nerf vague dans la nociception	41
2.2.3. Projections centrales du nerf vague	42
2.2.4. Neurotransmetteurs utilisés par le nerf vague.....	43
2.2.5. Rôle anti inflammatoire du nerf vague.....	43
3. Système endocrinien et immunitaire intestinal.....	44
4. SNC et immunomodulation	45
5. Modulateurs de la douleur viscérale.....	48
5.1. Canaux sodiques voltage dépendants	48
5.2. Canaux potassiques voltage dépendants.....	48
5.3. Modulateurs pharmacologiques de l'excitabilité neuronale.....	49

5.3.1.	Canaux ioniques liés à un ligand	49
5.3.2.	Récepteurs P2X (récepteurs de l'ATP).....	50
5.3.3.	Récepteurs 5HT ₃ de la sérotonine	50
5.3.4.	Récepteurs activés par la protéase PAR.....	50
5.4.	Nociception et sensibilisation périphérique.....	51
5.5.	Nociception et sensibilisation centrale	55
6.	AL et douleur viscérale	59
6.1.	Action immunomodulatrice	60
6.2.	Action sur le système sympathique	60
6.3.	Effet inhibiteur des récepteurs couplés aux protéines G	60
6.4.	Effet direct sur les muscles intestinaux.....	61
6.5.	Action sur la transmission nerveuse nociceptive	61
6.6.	Action directe sur les neurones de la corne postérieure de la moelle épinière.....	61
6.7.	Action sur la microglie	61
6.8.	Action sur les astrocytes.....	62
II- OBJECTIFS DE NOS TRAVAUX		63
III- MATERIEL ET METHODES		67
1.	Animaux	68
2.	Solutions utilisées.....	68
2.1.	Molécules thérapeutiques étudiées.....	68
2.2.	Carragénine λ	69
3.	Cathéters pré péritonéaux	69
4.	Modèles et techniques utilisés	69
4.1.	Modèle chirurgical (étude 1).....	69
4.2.	Bloc de la paroi abdominale (études 2 et 3).....	70
4.3.	Inflammation à la carragénine (études 2 et 3)	70
4.4.	Vagotomie (étude 3).....	73
4.5.	Prélèvements sanguins (étude 1)	74
4.6.	Lavage péritonéal (étude 1)	75
4.7.	Chromatographie en phase gazeuse (étude 1).....	75

4.8.	ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>).....	76
4.9.	Fixation et prélèvements des tissus (études 2 et 3).....	76
4.10.	Etude immunohistochimique (études 2 et 3)	77
4.11.	Etude comportementale (étude 1)	77
4.11.1.	Evaluation de la douleur viscérale	77
4.11.2.	Evaluation de la douleur pariétale	79
4.11.3.	Score clinique global.....	80
5.	Statistiques	81
IV-DEROULEMENT DES EXPERIENCES ET RESULTATS.....		82
1.	Déroulement de l'étude 1	83
2.	Résultats de l'étude 1.....	86
2.1.	Tests comportementaux	86
2.1.1.	Evaluation de la douleur viscérale par distension colorectale (n = 11 à 12) (Figure 19)...	86
2.1.2.	Evaluation de la douleur pariétale par application des filaments de von Frey (n = 10 à 11) (Figure 20).....	88
2.1.3.	Comportement global (n = 11 à 12).....	90
2.2.	Production de cytokines (TNF- α et IL-1 β)	91
2.2.1.	Production de TNF- α et d'IL-1 β après stimulation du sang total par du LPS (n = 8 à 10/groupe et par point d'évaluation) (Figure 21).....	91
2.2.2.	Production de TNF- α et d'IL-1 β par les macrophages du liquide péritonéal après stimulation par du LPS (n = 8 à 10/groupe et par point d'évaluation) (Figure 22).....	92
2.3.	Dosage de la concentration plasmatique de la ropivacaïne	95
3.	Déroulement de l'étude 2	96
4.	Résultats de l'étude 2.....	97
4.1.	Résultats de l'étude anatomique	97
4.2.	Effets du bloc de la paroi abdominale sur la douleur pariétale par application des filaments de von Frey après une inflammation induite à la carragénine (n = 7/groupe)	99
4.3.	Effets de la bupivacaïne par voie paravertébrale sur l'expression médullaire de c-Fos (n = 8/groupe)	100
5.	Déroulement de l'étude 3	102
6.	Résultats de l'étude 3.....	104

6.1. Effet de la bupivacaïne par voie paravertébrale sur l'expression de c-Fos au niveau médullaire et tronculaire (noyau solitaire) après une inflammation pariétale ou péritonéale chez le rat (n = 8/groupe)	104
6.2. Effet de la bupivacaïne par voie systémique et de la vagotomie droite préventive sur l'expression tronculaire (au niveau du noyau solitaire) de c-Fos suite à une péritonite à la carragénine (n = 8/groupe).....	107
V- DISCUSSION	109
1. Synthèse des résultats.....	110
2. Mécanismes d'action des deux techniques d'ALR évaluées	111
3. Mécanismes d'action des AL par voie systémique	114
4. Effet des AL sur l'inflammation.....	115
5. Comparaison entre ALR et AL systémique	117
6. Intérêt du bloc de la paroi abdominale chez le rat	118
7. Comparaison entre le bloc de la paroi abdominale et la vagotomie	120
8. Comparaison entre les AL par voie systémique et la vagotomie.....	122
VI- CONCLUSION ET PERSPECTIVES	123
1. Conclusion	124
2. Suite à envisager et perspectives	124
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	128
ARTICLE 1	137
ARTICLE 2	147

RESUME

La douleur abdominale post chirurgicale présente 2 composantes : (1) une composante pariétale liée à l'agression des muscles de la paroi abdominale et du péritoine pariétal et (2) une composante viscérale liée à l'agression du péritoine et des viscères. La douleur pariétale est bien systématisée, elle correspond à des métamères bien identifiés. A l'inverse, la douleur viscérale est souvent mal localisée. La différence entre les deux composantes de la douleur réside essentiellement dans l'innervation de la paroi abdominale et des viscères. Ainsi, la peau, les muscles de la paroi abdominale et le péritoine pariétal distribuent leurs afférences vers les racines nerveuses dorsales de la moelle épinière tandis que le péritoine viscéral et les viscères sont innervés par le nerf vague et par la moelle épinière à travers le système nerveux sympathique.

Les anesthésiques locaux administrés par l'intermédiaire d'un cathéter d'infiltration pariétal, d'un bloc de la paroi abdominale ou par voie systémique montrent une efficacité clinique dans l'analgésie post opératoire d'une chirurgie abdominale. Cependant, le mécanisme d'action des anesthésiques locaux en fonction de la voie d'administration n'est pas bien élucidé. Le but de nos études est d'explorer l'effet des anesthésiques locaux sur les deux composantes de la douleur abdominale dans un modèle animal en fonction de la voie d'administration.

Dans ce but, nous avons réalisé 3 études expérimentales :

1- Dans l'étude 1, nous avons comparé l'effet de la ropivacaïne administrée par voie systémique ou par un cathéter pré péritonéal sur la douleur pariétale et viscérale dans un modèle de laparotomie chirurgicale chez le rat. La douleur a été évaluée par une étude comportementale. Nous avons également étudié l'inflammation par un dosage des cytokines (IL-1 β et TNF- α) dans le sang et dans la cavité péritonéale.

2- Dans l'étude 2, nous avons mis au point un bloc de la paroi abdominale chez le rat. L'inflammation pariétale abdominale est induite par l'injection de la carragénine dans la paroi abdominale. Un bloc de la paroi abdominale est réalisé avec de la bupivacaïne. L'efficacité de ce bloc est évaluée par une étude comportementale et l'analyse de l'expression de c-Fos dans la moelle épinière par immunohistochimie.

3- Dans l'étude 3, l'inflammation pariétale et péritonéale est induite par injection de la carragénine dans la paroi abdominale ou dans la cavité péritonéale chez le rat selon le groupe expérimental. Nous avons ensuite comparé l'effet de la bupivacaïne par voie systémique à l'effet obtenu par l'administration de la bupivacaïne par un bloc de la paroi abdominale. De plus, l'effet des anesthésiques locaux par voie systémique a été comparé à une vagotomie chimique préventive. L'expression de c-Fos et de TNF- α dans la moelle épinière et le tronc cérébral a été mesurée dans le but de comparer l'efficacité des différentes techniques utilisées.

L'ensemble de ces travaux montre que lors d'une laparotomie, les anesthésiques locaux sont efficaces dans le traitement de la nociception aussi bien par voie systémique que par voie locorégionale. Nous avons démontré qu'un bloc de la paroi abdominale ainsi qu'une infiltration pré péritonéale diminuaient la transmission de la nociception viscérale vers le SNC par action directe sur les terminaisons nerveuses pariétales. De plus, lors d'une laparotomie, l'administration systémique d'anesthésiques locaux entraîne une efficacité dans l'inhibition de la transmission de la nociception viscérale vers le système nerveux central associée à un effet anti inflammatoire local et systémique supérieur à celui d'une administration locorégionale.

Des travaux complémentaires seront réalisés afin d'explorer (1) l'action des anesthésiques locaux sur les différentes cellules impliquées dans la douleur viscérale dont les neurones, les cellules microgliales et les astrocytes, ainsi que (2) les interactions existantes entre ces différentes cellules.

Mots clés : Anesthésiques locaux, douleur viscérale, cathéter pré péritonéal, bloc de la paroi abdominale, nerf vague.

ABSTRACT

The abdominal post surgical pain has two components : (1) a parietal component due to aggression of the abdominal wall muscles and the parietal peritoneum and (2) a visceral component due to aggression of the visceral peritoneum and viscera. Parietal pain is well localized; it corresponds to identified dermatomes. Otherwise, visceral pain is often badly localized. Difference between these two components of pain is mainly dependent on the innervation of the abdominal wall and viscera. So, skin, abdominal wall muscles and parietal peritoneum are innervated by the dorsal nervous roots of the spinal cord, whereas, visceral peritoneum and viscera are innervated by the vagus nerve and the spinal cord through the sympathetic nervous system.

Local anesthetics injected through a parietal catheter of infiltration, an abdominal wall block or by a systemic administration show clinical efficiency in post operative analgesia after abdominal surgery. However, the action mechanisms of local anesthetics according to their administration route are not well clarified. The purpose of our studies is to explore local anesthetics effect on both components of the abdominal pain in an animal model according to their administration route.

In this purpose we realized three experimental studies :

1- In the first study, we compared the effect of systemic administration or through a pre peritoneal catheter of ropivacaine on parietal and visceral pain in a model of surgical laparotomy in the rat. Pain was evaluated by a behavioral study. Inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α) concentrations were measured in blood and peritoneal cavity washing fluid.

2- In the second study, we established a block of the abdominal wall in the rat. Abdominal parietal inflammation was induced by carrageenan injection in the abdominal wall. The abdominal wall block was realized with bupivacaine. Efficiency of this block was evaluated by a behavioral study and analysis of c-Fos expression in the spinal cord by immunohistochemistry.

3- In the third study, parietal and peritoneal inflammation were induced by carrageenan injection in the abdominal wall or in the peritoneal cavity in the rat according to the experimental group. Then, we compared the effect of a systemic administration of bupivacaine to its administration by an abdominal wall block. Furthermore, the systemic effect of local anesthetics was compared to a preventive chemical vagotomy. c-Fos and TNF- α expression in the spinal cord and the brainstem were measured with the aim of comparing the efficiency of the various used techniques.

These works showed that during laparotomy, local anesthetics are effective in the treatment of the nociception as well as by systemic or locoregional administration. We showed that an abdominal wall block as well as a pre peritoneal administration decreased the transmission of the visceral nociception towards the central nervous system by direct action on the parietal nerve endings. Furthermore, during a laparotomy, systemic administration of local anesthetics inhibited the transmission of visceral nociception towards the central nervous system associated with a local and systemic anti inflammatory effects. This anti inflammatory effect was higher than that what we showed by locoregional administration of bupivacaine.

Additional works should be realized to explore (1) the action of local anesthetics on the various cells involved in the visceral pain among which neurons, microglial cells and astrocytes, as well as (2) the existing interactions between all these cells.

Keywords : Local anesthetics, visceral pain, pre peritoneal catheter, abdominal wall block, vagus nerve.

TABLE DES ABREVIATIONS

AL : Anesthésique local

ALR : Anesthésie LocoRégionale

AMP : Adénosine MonoPhosphate

AMPAR : *α-Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolepropionic Acid Receptor*

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ATP : Adénosine TriPhosphate

AWR : *Abdominal Withdrawal Reflex*

CCK : CholécystoKinine

c-Fos : Facteur de transcription nucléaire

CGRP : *Calcitonin Gene-Related Peptide*

COX-2 : Cyclo-OXYgénase

DAB : Di-Amino-Benzidine

DAMP : *Danger-Associated Molecular Pattern*

DSR : *Danger signal receptors*

ELISA : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ERK : *Extracellular signal-Regulated Kinases*

GABA : *Gamma AminoButyric Acid*

H₂S : Hydrogène Sulfuré

HMGB1 : *High Mobility Group Box 1*

5-HT : 5-HydroxyTryptamine IL : InterLeukine

IASP : *International Association for Study of Pain*

IM : Intra Musculaire

IP : Intra Péritonéal

IPO : Iléus Post Opératoire

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

KO : *Knock-Out*

LPS : LipoPolySaccharide

LTP : *Long Term Potentiation*(Randic, Jiang et al. 1993).

mGluR : *Metabotropic Glutamate Receptor*

NFκB: *Nuclear factor kappa B*

NGF: *Nerve Growth Factor*

NK : *Natural Killer*

NLR : *Nod Like Receptors*
NMDA : *N-méthyl-D-aspartic acid*
NMDAR : *N-Méthyl-D-aspartic Acid Receptor*
NO : Oxyde Nitrique
NPY : NeuroPeptide Y
PAMP : *Pathogen Associated Molecular Patterns*
PARs : *Protease Activated Receptor*
PRR : *Pattern Recognition Receptors*)
PBS : *Phosphate-Buffered Saline*
PGE2 : Prostaglandine E2
P2X et P2Y: *Subclasses of P receptors*
RPMI : *Roswell Park Memorial Institute medium*
RT-PCR : *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*
SNA : Système Nerveux Autonome
SNC : Système Nerveux Central
SNPS : Système Nerveux ParaSympathique
SNS : Système Nerveux Sympathique
TAP bloc : *Transversus Abdominis Plane Block*
TENS : Stimulation Electrique Cutanée
TLR : *Toll Like Receptors*
TNF : *Tumor Necrosis Factor*
TRP: *Transient Receptor Potential*
TRPA : *Transient receptor Potential Ankyrin*
TRPC : *Transient Receptor Potential Canonical*
TRPM : *Transient Receptor Potential Melastatin*
TRPP : *Transient Receptor Potential Polycystin*
TTX: TéTrodoToXine
VIP : *Peptide Intestinal Vasoactive*

LISTE DES FIGURES

Figure 1- Interactions entre les 3 systèmes nerveux, immunitaire et endocrinien en réponse aux changements du contenu endoluminal intestinal	25
Figure 2- Les neurones sensoriels du tube digestif.....	26
Figure 3- Schéma de l'innervation du tractus gastro-intestinal.....	28
Figure 4- Projections des fibres afférentes primaires cutanées, musculaires et viscérales dans les couches de Rexed de la corne postérieure de la moelle épinière.....	31
Figure 5- Schématisation des couches de Rexed sur une coupe transversale de moelle épinière.....	32
Figure 6- Les principaux relais supraspinaux impliqués dans la nociception.....	33
Figure 7- Schéma de l'expression de c-Fos dans le tronc cérébral après une anesthésie générale par voie inhalatrice, une distension colorectale et une péritonite chez le rat.....	35
Figure 8- Mécanismes anti inflammatoires de l'effet cholinergique.....	44
Figure 9- Schéma montrant la relation entre le nerf vague et ses projections au niveau du SNC avec les systèmes endocrinien et immunitaire.....	46
Figure 10- Hypersensibilité périphérique.....	52
Figure 11- Hypersensibilité périphérique avec apparition d'un chimiotactisme, d'une vasodilatation et d'une activation des cellules dendritiques et des lymphocytes T.....	53
Figure 12- Le phénomène d'hypersensibilité centrale.....	57
Figure 13- La théorie du portillon.....	58
Figure 14- Points d'injection de la carragénine (pariétaux et péritonéaux) dans les études 2 et 3.....	72
Figure 15- Zone d'injection au niveau cervical.....	73
Figure 16- Trajet du nerf vague.....	73
Figure 17- Les flèches montrent les différents groupes musculaires contractés selon le niveau du score AWR.....	79
Figure 18- Déroulement des expériences de l'étude 1.....	85

Figure 19- Pression colorectale tolérée (en mmHg) générant une douleur viscérale détectée selon le score AWR.....	87
Figure 20- Pression pariétale tolérée (en g/mm ²) générant une douleur pariétale par application des filaments de von Frey sur 2 points de la plaie chirurgicale.....	89
Figure 21- Concentrations de TNF- α et d'IL-1 β produits par les leucocytes.....	92
Figure 22- Concentrations de TNF- α et d'IL1- β produits par les macrophages péritonéaux dans les groupes de laparotomie à J0, J1 et J2.....	94
Figure 23- Innervation de la paroi abdominale du rat.....	97
Figure 24- Diffusion de l'Indigo Carmin dans les muscles paravertébraux du rat.....	98
Figure 25- Imprégnation nerveuse à l'Indigo Carmin.....	99
Figure 26- Effet de la bupivacaïne injectée par voie paravertébrale sur la douleur pariétale.....	100
Figure 27- Effet de la bupivacaïne administrée par voie paravertébrale sur le niveau d'expression de c-Fos au niveau de la moelle épinière après une inflammation pariétale.....	101
Figure 28- Déroulement des expériences de la deuxième étape de l'étude 3.....	103
Figure 29- Expression de c-Fos au niveau de la moelle épinière au cours de l'inflammation de la paroi abdominale ou intra péritonéale.....	105
Figure 30- Expression de c-Fos au niveau du noyau solitaire au cours de l'inflammation de la paroi abdominale ou intra péritonéale.....	106
Figure 31- Expression tronculaire de c-Fos au niveau des noyaux du tractus solitaire droit et gauche 2 heures après une péritonite chimique à la carragénine.....	108

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1- Résumé de l'innervation du péritoine.....	27
Tableau 2- Rôle du nerf vague, des nerfs somatiques et du SNS dans l'inflammation périphérique.....	28
Tableau 3- Tableau récapitulatif des différentes branches abdominales du nerf vague et les organes qu'elles innervent.....	38
Tableau 4- Groupes expérimentaux de l'étude 1.....	84
Tableau 5- Groupes expérimentaux de la deuxième partie de l'étude 2.....	96
Tableau 6- Groupes expérimentaux dans la première étape expérimentale de l'étude 3.....	102
Tableau 7- Groupes expérimentaux de la deuxième étape expérimentale de l'étude 3.....	103

TERMINOLOGIES DE L'IASP

D'après la version 2001 de l'IASP

<http://www.iasp-pain.org>

Douleur : expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à un dommage tissulaire existant ou potentiel ou décrit comme tel

Il existe trois types de douleur :

Douleur aiguë physiologique : localisée, transitoire, en réponse à un stimulus à partir d'un seuil dit de nociception, cessant dès la fin de la stimulation. Fonction d'alerte face à une menace de l'intégrité corporelle

Douleur neuropathique : douleur initiée ou causée par une lésion primaire ou un dysfonctionnement du système nerveux

Douleur inflammatoire : liée au développement d'une inflammation locale

Définitions

Nociception : processus sensoriel de perception de la douleur, terme largement utilisé pour les études menées chez l'animal

Hyperalgésie : Réponse douloureuse accrue en réponse à un stimulus normalement douloureux thermique (*hyperalgésie thermique*) ou mécanique (*hyperalgésie mécanique*)

une *hyperalgésie primaire* liée à une sensibilisation des nocicepteurs périphériques

une *hyperalgésie secondaire* liée à une sensibilisation centrale

Allodynie : douleur provoquée par un stimulus normalement non douloureux

Analgesie : absence de douleur en réponse à un stimulus normalement douloureux

Antalgie : prise en charge de la douleur

Anesthésie : absence de perception de toute modalité sensorielle

Seuil de nociception : expérience douloureuse la moins intense qu'un sujet puisse percevoir

I- INTRODUCTION

La chirurgie provoque des lésions tissulaires qui sont décrites comme non spécifiques avec des réactions inflammatoires et des cascades de sensibilisation, mais aussi des atteintes nerveuses qui participent également à la réaction inflammatoire. Notre laboratoire s'est intéressé à deux types de chirurgie : la chirurgie périphérique et la chirurgie abdominale. Dans ces deux types de chirurgie, il existe d'emblée un certain nombre de différences en ce qui concerne la douleur, l'inflammation et les mécanismes inflammatoires mis en jeu. La systématisation métamérique est d'ailleurs totalement différente selon que l'on s'adresse au système cutané et locomoteur d'une part ou viscéral d'autre part. Classiquement, l'étude de la douleur aiguë post opératoire ou traumatique utilise des modèles qui font intervenir la transmission par les fibres A β , A δ et C dont le noyau cellulaire se situe dans le ganglion spinal et le relais au niveau des couches de Rexed de la corne postérieure de la moelle épinière. Ceci correspond à une systématisation métamérique parfaitement codifiée qui est valide pour la douleur d'origine cutanée, musculaire ou même osseuse. A l'inverse, l'innervation douloureuse provenant des viscères thoraciques ou abdomino-pelviens échappe à ce schéma simple et paraît beaucoup plus compliquée.

Le modèle animal utilisé dans notre laboratoire pour étudier la douleur périphérique repose sur l'injection de carragénine dans la patte du rat. Il a été démontré au sein de notre laboratoire, qu'une inflammation périphérique unilatérale est associée à une activation bilatérale des cytokines et de COX-2 au niveau des ganglions rachidiens et au niveau spinal suggérant un phénomène médullaire segmentaire (Beloeil, Ababneh et al. 2006; Pham-Marcou, Beloeil et al. 2008). Le blocage du transport axonal (par exemple par un bloc nerveux) le long du nerf périphérique au cours d'une inflammation périphérique inhibe totalement les phénomènes inflammatoires (Deruddre, Combettes et al. 2010); alors qu'un anesthésique local (AL) par voie systémique n'a aucun effet (Beloeil, Ababneh et al. 2006). De plus, nous avons démontré qu'une lésion nerveuse prolongée par neurolyse du nerf sciatique inhibait l'inflammation systémique induite par une injection périphérique de carragénine au niveau de la patte du rat (Pham-Marcou, Gentili et al. 2005). Les mécanismes impliqués sont donc locaux, segmentaires puis probablement systémiques.

Lors d'une laparotomie, la distinction entre la douleur viscérale et la douleur

pariétale est difficile. La douleur viscérale est souvent mal localisée, irradiée ou transférée à un site cutané et provoque généralement de fortes réponses autonomes et émotives ainsi que des contractions musculaires toniques. Ceci implique plusieurs mécanismes : d'abord, les afférences nerveuses provenant des viscères sont relativement moins nombreuses que les afférences cutanées et ne constituent que 2 à 15% de la totalité des afférences arrivant à la moelle épinière (Ness and Gebhart 1990). D'autre part, tous les interneurons médullaires recevant des afférences viscérales reçoivent également des afférences cutanées et possèdent ainsi un caractère « viscérocutané ». Par contre, tous les interneurons recevant des afférences cutanées ne reçoivent pas des afférences viscérales et possèdent un caractère simplement « cutané ». Par ailleurs, en plus des convergences médullaires viscérocutanées, il existe des convergences viscéroviscérales vers les mêmes interneurons (Ness and Gebhart 1990). De plus, l'innervation viscérale passe par la moelle épinière, le nerf vague et le système nerveux autonome (SNA) (Kunze and Furness 1999).

Lors d'une laparotomie, il existe une inflammation systémique associée à la douleur post opératoire. La cascade d'évènements mise en jeu au niveau local, médullaire et systémique est peu détaillée dans la littérature. On peut supposer que les évènements impliqués lors d'une laparotomie sont différents de ceux impliqués lors d'une inflammation périphérique. Il est clairement admis que la composante inflammatoire augmente la morbidité post opératoire et que son inhibition présente un effet favorable sur la reprise du transit intestinal et pourrait prévenir la survenue de l'iléus post opératoire (IPO) (Dragusin, Wehner et al. 2006; De Backer, Elinck et al. 2009; Wehner, Straesser et al. 2009).

En effet, lors d'une laparotomie, l'IPO représente une cause majeure d'inconfort post opératoire. Suite à une stimulation chirurgicale, l'IPO évolue en deux phases. La phase initiale est provoquée par la stimulation chirurgicale d'un réflexe nerveux médullaire et dure jusqu'à 3 heures après la fin de la chirurgie. La deuxième phase est inflammatoire. Elle est provoquée par l'activation des macrophages et des mastocytes dans la couche musculuse de la paroi intestinale. Elle apparaît 3 heures après la stimulation chirurgicale et dure jusqu'à 3 jours après la fin de la chirurgie (Boeckxstaens GE 2009).

Dans le cadre de la chirurgie abdominale, l'administration d'AL par l'intermédiaire d'un cathéter péridural thoracique reste la technique de référence. Cette technique permet l'inhibition des afférences nociceptives spinales pariétales et viscérales. Cependant, l'administration d'AL par l'intermédiaire d'un cathéter pré péritonéal permet une réduction de la consommation de morphine, une analgésie satisfaisante et une réhabilitation post opératoire plus rapide après colectomie. Au vu des résultats de Beaussier et al., le blocage des afférences péritonéales (au moins du péritoine pariétal) semble nécessaire pour l'obtention d'une analgésie efficace (Beaussier, El'Ayoubi et al. 2007). Un blocage des afférences pariétales par un bloc du muscle transverse abdominal (TAP) montre également une efficacité certaine dans le traitement de la douleur après les différents types de chirurgie abdominale comme la chirurgie colorectale (Bharti, Kumar et al. 2011), la césarienne (Baaj, Alsatli et al. 2006), la cholécystectomie (Ra, Kim et al. 2010). De ce fait, on peut supposer que l'inhibition des afférences nociceptives pariétales pourrait contribuer à la réduction de la composante viscérale de la douleur.

Pour une meilleure compréhension des différentes interactions médullaires qui existent entre les 3 types de douleur, on peut citer 4 études expérimentales :

- l'étude de Peles et al. ont pu démontrer qu'une stimulation cutanée nociceptive sur un territoire convergent provoquait une hypersensibilité neuronale médullaire. Cette hypersensibilité touche les mêmes neurones que ceux qui sont stimulés lors d'une distension colorectale (Peles, Miranda et al. 2004).

- Cameron et al. ont déjà démontré dans un modèle animal qu'une stimulation nociceptive au niveau de la patte entraînait une hypersensibilité colique ainsi qu'une diminution de la pression colorectale tolérée par les rats. Par contre, cette étude n'a pas pu mettre en évidence une hypersensibilité périphérique (au niveau de la patte) après une stimulation colique (Cameron, Brennan et al. 2008).

- Contrairement à Cameron et al., Lamb et al. ont pu démontrer qu'une colite expérimentale entraînait une hypersensibilité périphérique tactile qui n'est pas accompagnée d'une hypersensibilité thermique (Lamb, Zhong et al. 2006).

- Menétrey et al. ont trouvé plusieurs différences dans l'expression médullaire de c-Fos entre une stimulation viscérale et une stimulation somatique périphérique. Une différence réside dans l'extension cervicocaudale induite par la stimulation viscérale. Une deuxième différence réside dans la distribution symétrique et bilatérale lors d'une stimulation viscérale contre une distribution unilatérale lors d'une stimulation somatique. Et enfin, une différence est notée dans la stimulation des couches cellulaires superficielles des cornes postérieures de la moelle épinière lors d'une stimulation viscérale et plus profonde lors d'une stimulation périphérique (Menetrey, Gannon et al. 1989).

Le but de nos travaux est de mieux comprendre les interactions qui existent entre la douleur pariétale et la douleur viscérale suite à une chirurgie abdominale et l'effet des AL sur ces 2 composantes de la douleur abdominale. Au cours de nos travaux, nous n'avons pas abordé les interactions avec les différentes pathologies de la muqueuse intestinale mais plutôt à l'inflammation péritonéale et la manipulation des intestins.

1. Innervation du tube digestif et du péritoine

1.1. Innervation du tube digestif

La muqueuse intestinale est considérée comme le deuxième organe sensoriel après la peau. Elle présente trois types d'éléments détecteurs : des neurones, des cellules endocriniennes et des cellules immunitaires. La muqueuse intestinale est en contact direct avec le contenu intestinal pour permettre une absorption alimentaire efficace et en même temps protège l'organisme contre l'intrusion d'éléments dangereux comme les bactéries et les toxines. Des signaux sont envoyés localement pour moduler la motilité intestinale, les sécrétions, la perfusion tissulaire et les défenses tissulaires. D'autres signaux sont envoyés à d'autres organes digestifs comme la vésicule biliaire et le pancréas pour moduler leurs sécrétions ou encore vers le SNC pour modifier le comportement alimentaire. Le système de détection intestinal est très bien développé ; ainsi, le système nerveux entérique contient plus de 10^8 neurones, au moins vingt hormones identifiées et 70 à 80% des cellules immunitaires présentes dans

l'organisme. Le tube digestif possède la capacité de répondre aux changements de son contenu. Il est donc important de comprendre le fonctionnement sensoriel de l'intestin, la réaction du corps à l'information intestinale et les interactions entre les systèmes nerveux, hormonal et immunitaire (Figure1).

Les neurones sensoriels (Figures 1 et 2) :

Ce sont les neurones primaires et afférents qui détectent l'état du tissu intestinal. Il existe 3 types de neurones primaires afférents dans la paroi intestinale :

- les neurones primaires afférents intrinsèques appelés également neurones intrinsèques sensoriels dont les corps cellulaires et les connexions se trouvent dans la paroi intestinale. Ils sont nécessaires à la génération du réflexe approprié au contenu intestinal. Cette réponse consiste en un changement dans les mouvements propulsifs musculaires, dans le débit sanguin local et dans la modulation de la sécrétion hydrique et électrolytique de la paroi intestinale. Nous retrouvons dans la littérature trois types de cellules primaires afférentes intrinsèques en fonction de leurs stimuli spécifiques :

* les neurones primaires afférents intrinsèques chimiosensitifs répondent à des agents chimiques présents dans la lumière intestinale comme les acides inorganiques et les acides gras à chaîne courte. Ces cellules sont multipolaires avec des branches qui sont en contact d'une part, avec l'épithélium absorptif et d'autre part, avec les interneurones ou les motoneurones. Cette organisation crée un réseau qui potentialise l'action des neurones primaires afférents intrinsèques. La stimulation des neurones primaires afférents intrinsèques se fait de façon indirecte par les hormones sécrétées par les cellules entéroendocrines. Les hormones souvent citées dans ce contexte sont la sérotonine ou 5-hydroxytryptamine (5-HT), la cholécystokinine (CCK) et la motiline.

* Les neurones primaires afférents intrinsèques sensibles à l'étirement répondent de deux façons : (1) une réponse phasique au début de l'étirement et (2) une décharge du potentiel d'action maintenue suite à un étirement. La réponse phasique initiale est inhibée par les inhibiteurs calciques comme la nifédipine tandis que la réponse de maintien est inhibée par les curares (Furness, Kunze et al. 1999).

* Les mécanorécepteurs de la muqueuse intestinale sont présents dans la sous-muqueuse et se projettent dans le plexus mésentérique.

- Les neurones intestinofuges sont des neurones dont le corps cellulaire se trouve dans le plexus mésentérique et dont les projections axonales sont localisées à l'extérieur de la paroi intestinale. Ils sont plus nombreux dans le colon que dans l'intestin grêle. Les axones de ces cellules présentent des synapses avec les corps cellulaires des neurones sympathiques. Ces synapses sont cholinergiques et excitatrices. La fonction essentielle des neurones intestinofuges reste le contrôle de la motilité intestinale. Ce contrôle se fait essentiellement par l'intermédiaire d'un réflexe appelé « le réflexe inhibiteur entéroentérique ». C'est un système de rétrocontrôle négatif qui autorise à la partie distale de l'intestin la modulation de l'activité de l'intestin proximal. Ce réflexe est activé suite à une stimulation mécanique par traction sur la paroi intestinale ou alimentaire. D'autre part, les neurones intestinofuges modulent par l'intermédiaire des neurones sympathiques la sécrétion hydro électrolytique dans la lumière intestinale.

- Les neurones primaires afférents extrinsèques sont des neurones dont les corps cellulaires se trouvent dans le nerf vague ou les ganglions spinaux dorsaux. Ils jouent un rôle dans la transmission de l'information sur l'état du tube digestif vers le système nerveux central (SNC) y compris l'information nociceptive (Sengupta and Gebhart 1994). Les neurones afférents primaires vagues ont leur corps cellulaire dans le ganglion noueux ou plexiforme et les axones arrivent sur les intestins par les fibres nerveuses du nerf vague. Au niveau thoracique et lombaire, les neurones afférents primaires spinaux ont leur corps cellulaire dans le ganglion dorsal. Les axones de ces neurones arrivent vers le tube digestif par les fibres des plexus mésentérique et splanchnique après passage par les ganglions sympathiques. Par ailleurs, au niveau sacré, les corps cellulaires se trouvent dans les ganglions sacrés et les axones arrivent vers le colon et le rectum par l'intermédiaire des nerfs pelviens.

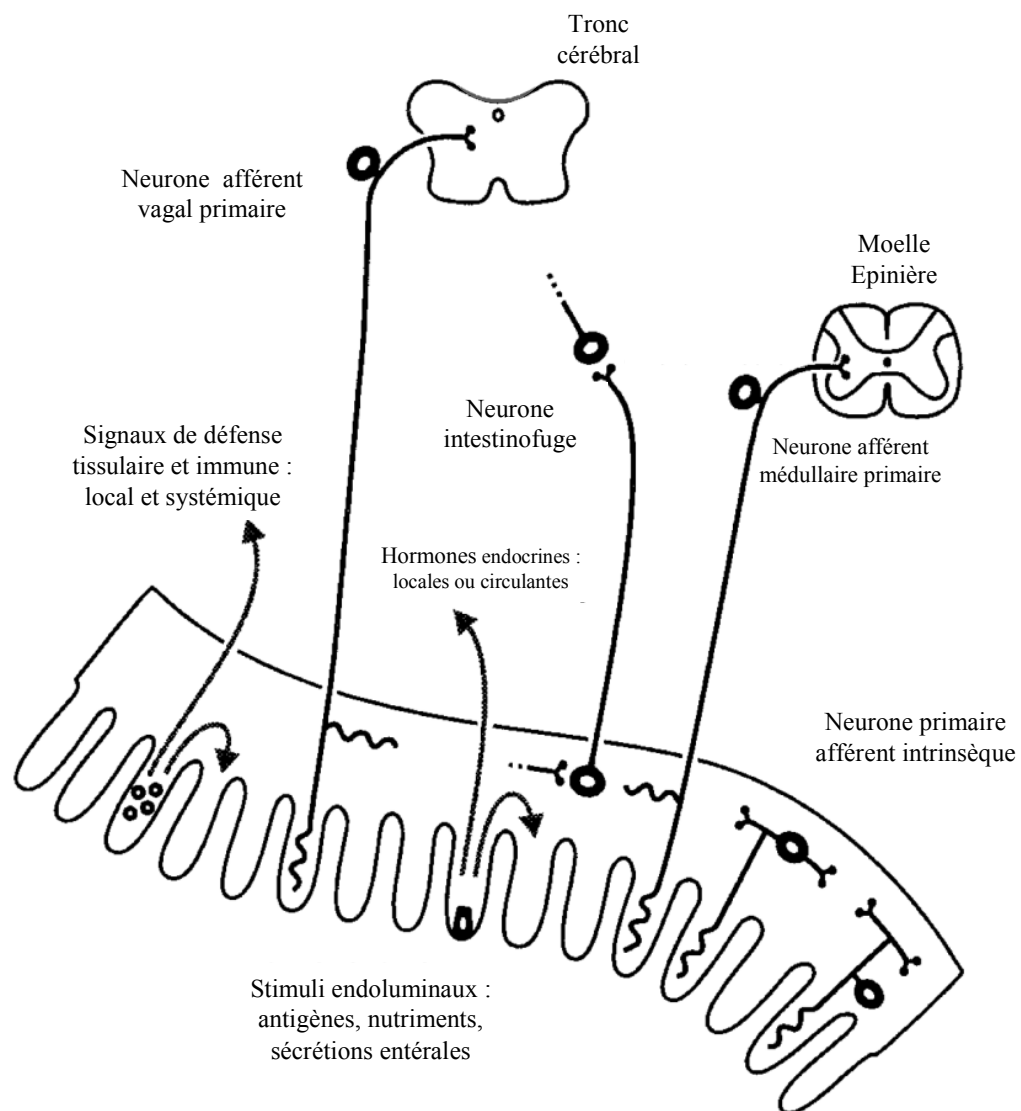


Figure 1- Interactions entre les 3 systèmes nerveux, immunitaire et endocrinien en réponse aux changements du contenu endoluminal intestinal (Furness, Kunze et al. 1999)

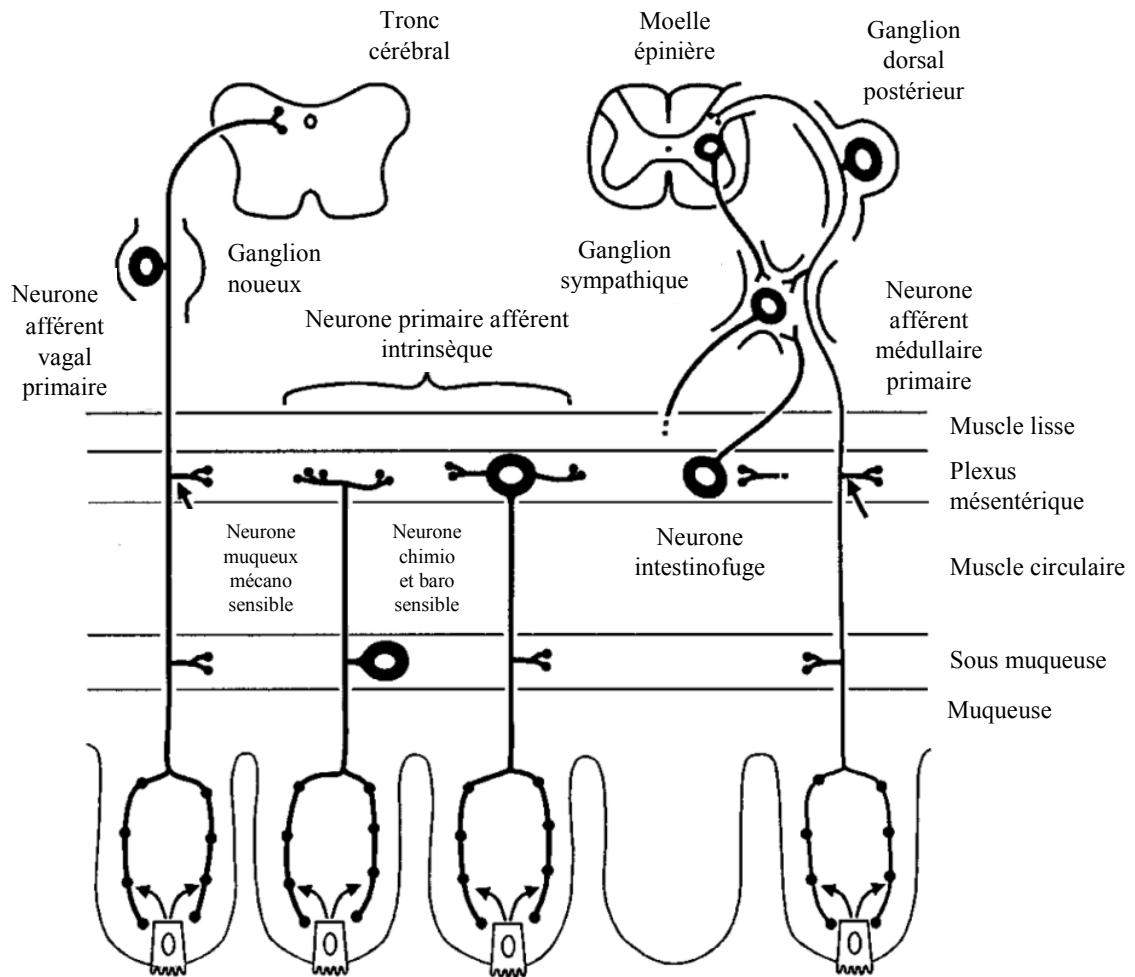


Figure 2- Les neurones sensoriels du tube digestif. Organisation du plexus mésentérique; les neurones afférents médullaires et vagues (Furness, Kunze et al. 1999)

1.2. Innervation du péritoine

La distribution de l'innervation du péritoine entre le nerf vague et la moelle épinière a été le sujet d'une étude réalisée par Tanaka et al. (Tanaka, Matsugami et al. 2002). Les chercheurs ont utilisé des traceurs fluoro-dorés injectés dans le péritoine pariétal, le diaphragme, le mésocolon, le mésentère et le péritoine viscéral qui couvre l'estomac, l'intestin grêle, le colon, le foie, la rate, les reins, la vessie et l'utérus. Les résultats de cette étude montrent que : (1) le péritoine pariétal est innervé exclusivement par les nerfs spinaux, (2) la partie périphérique du diaphragme est innervée par les nerfs spinaux et (3) la partie centrale du diaphragme est innervée par

les nerfs spinaux mais aussi par le nerf vague. (4) Le péritoine viscéral qui couvre l'estomac, l'intestin grêle et le caecum est innervé par les racines nerveuses spinales de T4 à T13 ainsi que par le nerf vague. (5) Le péritoine viscéral qui couvre le colon est innervé par les nerfs spinaux de T13 à L2 et de L5 à S1. (6) Le mésentère est innervé par les nerfs spinaux de T5 à T13 et par le nerf vague (Tableau 1).

Tableau 1- Résumé de l'innervation du péritoine. Le péritoine pariétal est entièrement innervé par la moelle épinière alors que le péritoine viscéral est innervé par les nerfs spinaux et le nerf vague

+ nombre de cellules marquées < 10 ; ++ : 10 < nombre de cellules marquées < 50 ; +++ : nombre de cellules marquées > 50

Organe	Innervation médullaire	Innervation vagale
Péritoine pariétal	Exclusivement	-
Diaphragme :		
- Partie centrale	C4-C5	+
- Partie périphérique	C5 et T4-T12	-
Péritoine viscéral couvrant :		
- Estomac	T4-T13	+++
- Intestin grêle	T6-T13	+
- Coecum	T8-T11	++
- Colon	T13-L2 et L5-S1	+
Mésentère	T5-T13	++
Mésocolon	T7-T13	+++

Après cette description de l'innervation du tube digestif et du péritoine, nous pouvons conclure que toute nociception au niveau de la cavité abdominale stimule simultanément les nerfs spinaux, le nerf vague et le SNA sympathique et parasympathique (Figure 3 et tableau 2).

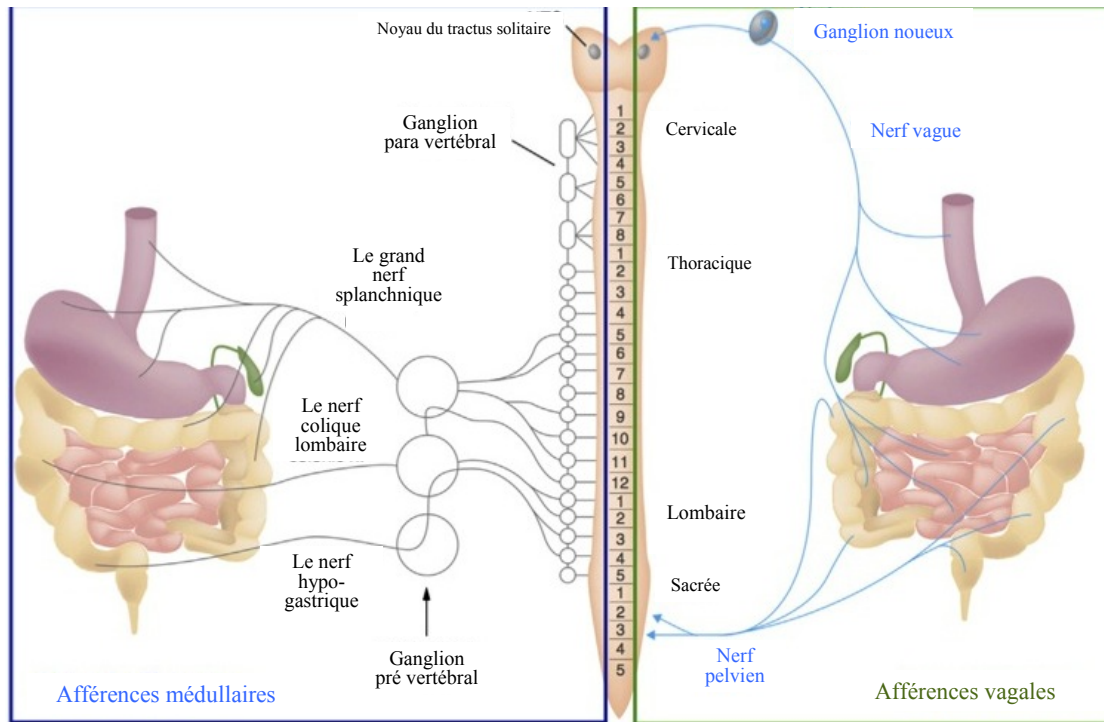


Figure 3- Schéma de l'innervation du tractus gastro-intestinal. A gauche : les afférences médullaires passant par les ganglions pré et paravertébraux. A droite : les afférences vagues avec le nerf vague qui innerve la totalité du tube digestif à part les 2/3 distaux du colon qui sont innervés par le nerf pelvien. Ces 2 voies passent finalement par le noyau du tractus solitaire au niveau bulbaire (Gebhart 2000)

Tableau 2- Rôle du nerf vague, des nerfs somatiques et du SNS dans l'inflammation périphérique (Waldburger and Firestein 2010)

	Nerf vague	Nerf somatique	Sympathique
Mécanisme central	Stimulation réflexe par les cytokines	Activation des récepteurs NMDA dans le cerveau et la moelle épinière par la douleur et l'inflammation	Mécanismes médullaires et supra médullaires
Neurotransmetteur périphérique	Acétylcholine	Adénosine	Noradrénaline
Effet sur l'inflammation périphérique	Diminue la sécrétion de cytokines et de chimiokines	Augmente l'inflammation par diminution de l'adénosine	Diminue l'inflammation pendant la phase inflammatoire

2. Nociception

La nociception concerne les mécanismes élaborés en réponse à une stimulation menaçant l'intégrité de l'organisme. En périphérie, les stimulations nociceptives activent directement ou indirectement, via les processus inflammatoires ou mécaniques, les terminaisons libres des nocicepteurs et les fibres fines amyéliniques C ou faiblement myélinisées A δ . Ces fibres se projettent dans la corne dorsale, lieu de

d'intégration et de contrôle de ces messages.

Les nerfs périphériques assurent la transmission centripète et centrifuge de trois types d'informations relatives à la somesthésie, à la motricité et au système végétatif. Les messages nociceptifs sont générés au niveau des terminaisons libres amyéliniques. En réalité, les messages nociceptifs sont générés au niveau des terminaisons libres amyéliniques constituant des arborisations plexiformes dans les tissus cutanés, musculaires et articulaires. Les messages sont ensuite véhiculés par des fibres nerveuses périphériques (fibres A δ et C) qui, rassemblées au sein des nerfs, envoient leurs messages vers la moelle épinière. Ces fibres dont le corps cellulaire se trouve dans les ganglions des racines rachidiennes postérieures, sont classées selon leur diamètre et la présence ou pas d'une gaine de myéline. On distingue trois grands groupes de fibres afférentes : A β , A δ et C.

Les fibres A β possèdent une importante gaine de myéline (diamètre 6-20 μ m). Elles conduisent rapidement l'influx nerveux (30-120 m/s) et sont responsables des sensations tactiles ou proprioceptives pour les fibres en provenance des fuseaux neuromusculaires et des organes tendineux de Golgi.

Les fibres A δ sont peu myélinisées (diamètre 1-5 μ m) et conduisent l'influx nerveux à une vitesse moyenne (4-30 m/s).

Les fibres C ne sont pas myélinisées (diamètre 0,3-1,5 μ m) et conduisent l'influx nerveux lentement (0,4-2 m/s). Elles transmettent les sensations douloureuses et thermiques (Melzack 1971). Les fibres C sont très nombreuses puisqu'elles constituent 80% des fibres afférentes cutanées et la quasi-totalité des fibres afférentes viscérales. Notons que les fibres A δ et C ne sont pas exclusivement nociceptives puisque certaines d'entre elles proviennent des mécanorécepteurs et des thermorécepteurs à bas seuil (Kumazawa 1990). Par ailleurs, environ 20% des fibres C sont des fibres sympathiques post ganglionnaires efférentes dont le corps cellulaire est situé dans les ganglions paravertébraux de la chaîne sympathique.

2.1. Voies médullaires de la nociception

Les fibres d'origine cutanée provenant des « nocicepteurs polymodaux C » qui répondent à des stimuli nociceptifs de différentes natures (thermique, mécanique et chimique) constituent les trois quarts des afférences cutanées. « Les nocicepteurs polymodaux » A δ ont des caractéristiques très proches des fibres C. L'innervation de la peau compte en moyenne 200 terminaisons libres par cm². Bien que variable d'un territoire à un autre, la répartition des nocicepteurs est relativement homogène au niveau cutané, ce qui permet de localiser plus facilement aussi bien la douleur que les autres sensations somesthésiques.

Des facteurs humoraux sont susceptibles d'activer ou de sensibiliser les nocicepteurs suite à une lésion tissulaire. Ainsi, trois groupes de facteurs interviennent : (1) les premiers sont directement liés à la lésion tissulaire et activent les nocicepteurs sans doute déjà excités par le stimulus causal lui-même ; (2) les seconds sont liés aux processus inflammatoires et sensibilisent les nocicepteurs aux divers agents capables de les activer ; (3) les derniers sont des neuromodulateurs sécrétés par les nocicepteurs et capables, comme la substance P, d'activer ou de sensibiliser ces derniers directement ou indirectement.

2.1.1. Projections des fibres afférentes primaires

Après un trajet dans les nerfs périphériques, les fibres afférentes primaires cutanées gagnent le SNC par les racines rachidiennes postérieures ou leurs équivalents au niveau du nerf trijumeau ou du nerf vague. Les corps cellulaires sont localisés dans les ganglions rachidiens.

A la jonction radiculomédullaire, les fibres de gros calibre se séparent de celles de petit calibre. Les fibres amyéliniques occupent la partie latéroventrale de la racine postérieure, alors que les fibres de gros calibre ont une position médiadorsale.

Les fibres A β responsables de la sensation tactile et proprioceptive envoient des collatérales dans les cornes postérieures de la moelle épinière surtout dans les couches III et V de Rexed et se projettent vers la jonction cervicobulbaire dans les noyaux

« *gracilis* » et « *cuneatus* » d'où ils activent le système lemniscal.

Les fibres A δ et C se divisent en une branche ascendante et une branche descendante et n'envoient des collatérales que vers la corne postérieure de la moelle. Après une progression sur un à six segments dans la substance blanche dorsolatérale, ces fibres se projettent dans les couches I et II (superficielles) de Rexed. Les fibres A δ se projettent également dans les couches V.

Les projections d'origine musculaire se terminent dans les couches V et VI de Rexed, tandis que les projections viscérales se terminent dans les couches I, V, VII et X de Rexed et parfois de façon bilatérale (Figures 4 et 5).

Les afférences nociceptives cutanées, musculaires et viscérales convergent dans les couches I et V de Rexed au niveau de la corne postérieure de la moelle épinière.

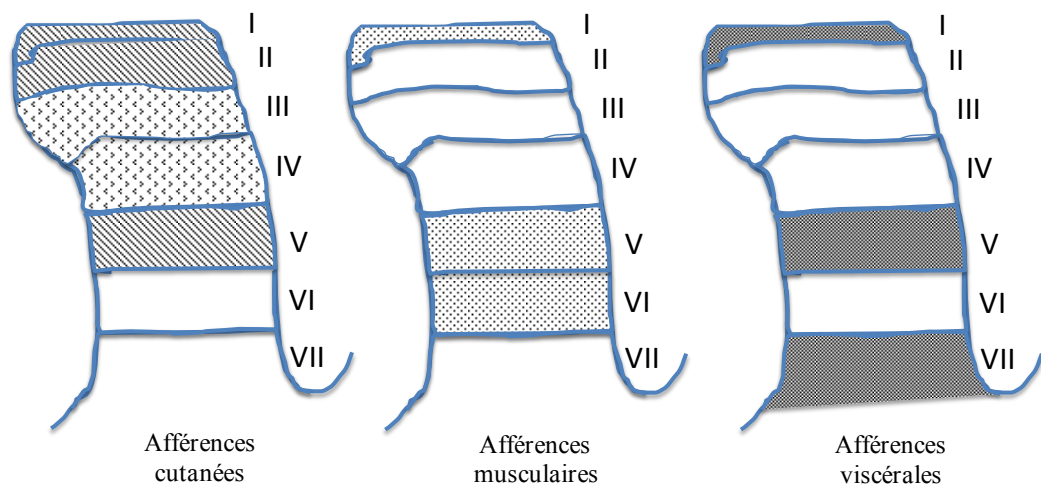


Figure 4- Projections des fibres afférentes primaires cutanées, musculaires et viscérales dans les couches de Rexed de la corne postérieure de la moelle épinière (Guirimand and Le Bars 1996). Les afférences cutanées nociceptives arrivent au niveau des couches I, II et V. Au niveau des couches III et IV, les afférences cutanées ne sont pas nociceptives

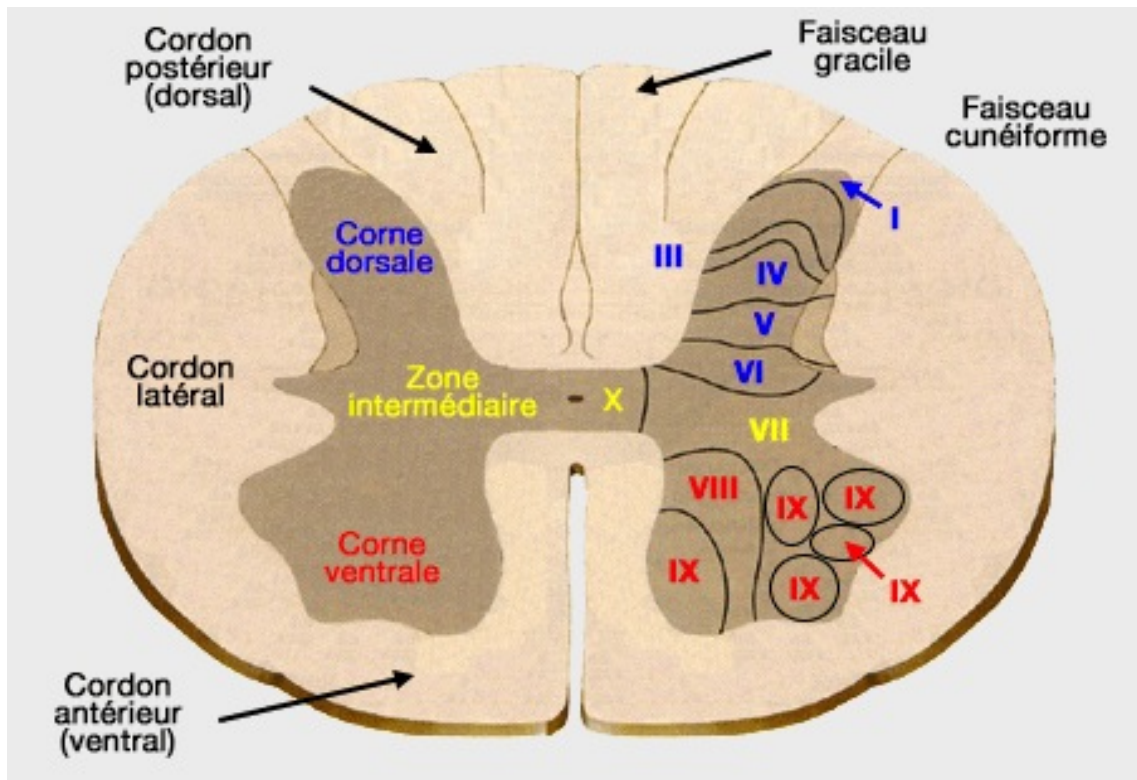


Figure 5- Schématisation des couches de Rexed sur une coupe transversale de moelle épinière. Cette figure montre les différents faisceaux médullaires ascendants qui participent à la transmission de la nociception vers les projections supra médullaires

2.1.2. Voie ascendante

Les neurones nociceptifs de la corne postérieure se projettent essentiellement vers trois sites principaux : la formation réticulée, le mésencéphale et le thalamus. Après leur passage par la corne postérieure, les fibres des neurones de projection rejoignent les faisceaux ascendants pour atteindre les structures supraspinales. La plus grande partie de ces fibres croise la ligne médiane par la commissure grise antérieure et gagne le quadrant antérolatéral controlatéral. Une autre partie de ces fibres ne croise pas la ligne médiane et constitue le cordon postérieur. La nociception viscérale passe surtout par le cordon postérieur alors que la nociception somatique passe essentiellement par le quadrant antérolatéral (Willis, Al-Chaer et al. 1999) (Figure 6).

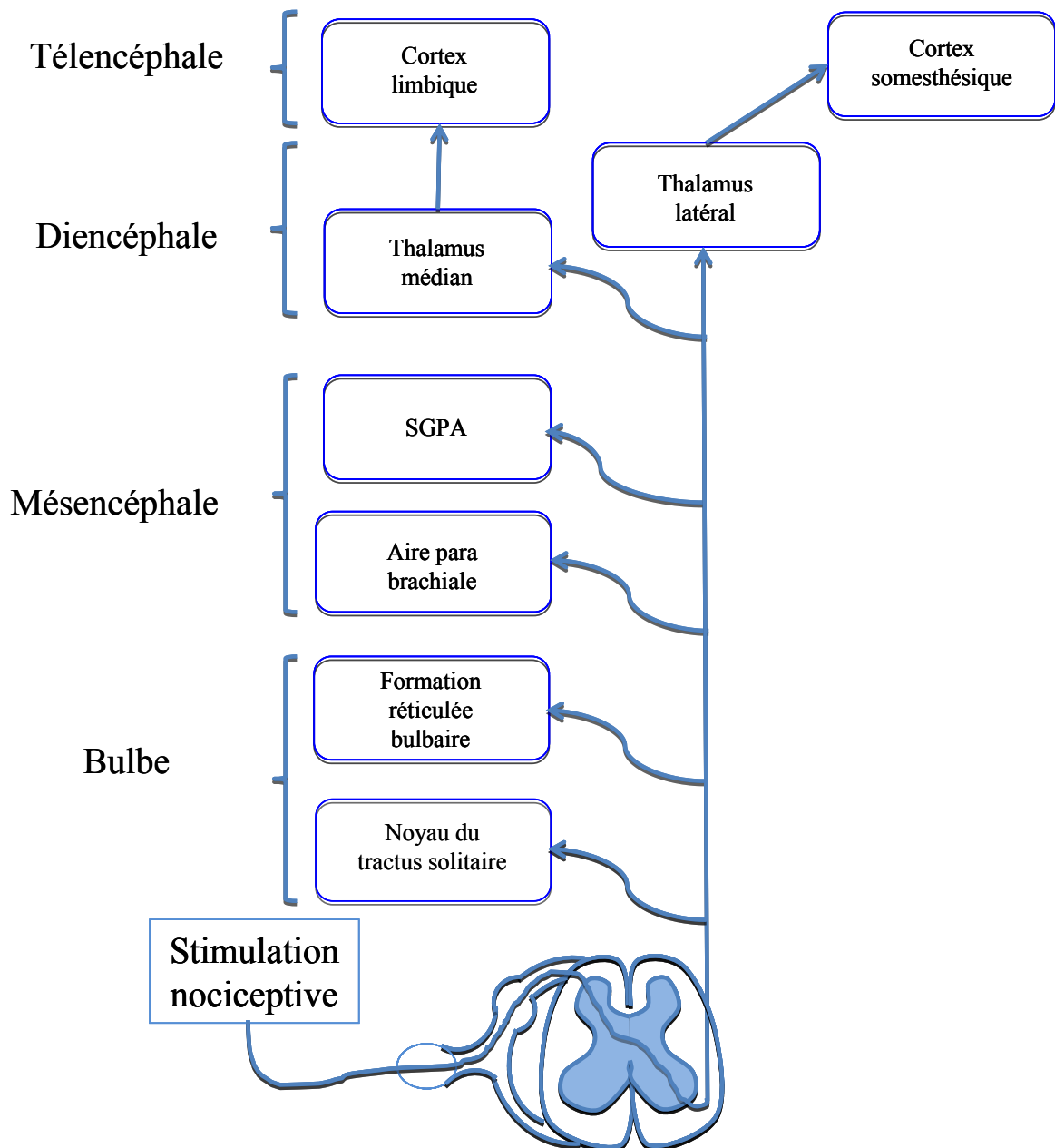


Figure 6- Les principaux relais supraspinaux impliqués dans la nociception. Après relais dans la corne postérieure de la moelle, la plupart des messages nociceptifs croisent la ligne médiane par la commissure grise antérieure et gagnent les centres supérieurs par le quadrant antérolatéral puis se projettent massivement sur la formation réticulée du tronc cérébral et du thalamus (Guirimand and Le Bars 1996)

Parmi les faisceaux du quadrant antérolatéral les plus étudiés on retrouve les faisceaux spinothalamique et spinoréticulaire.

a- Faisceau spinothalamique

Il rassemble des neurones issus des couches I, IV, V, VI, VII et VIII de Rexed dont la majorité répond à des stimulations nociceptives. Ils cheminent dans le quadrant

antérolatéral de la moelle du côté controlatéral à leur site d'origine. Les neurones issus de la corne postérieure se projettent sur le thalamus (dans le noyau ventro-postéro-latéral et groupe postérieur). Les neurones issus des couches VII et VIII de Rexed se terminent dans les régions médianes du thalamus (noyau central latéral). Cependant, il existe un certain recouvrement entre ces 2 populations puisque certains neurones se projettent à la fois sur les parties latérale et médiane du thalamus. Un contingent particulier, issu de la couche I, se projette vers le « *nucleus submedius* ».

b- Faisceau spinoréticulaire

Les mêmes régions de la substance grise médullaire donnent naissance à des neurones spinoréticulaires impliqués dans la nociception, dont les axones cheminent également dans le quadrant antérolatéral. Contrairement au faisceau spinothalamique, une partie des fibres du faisceau spinoréticulaire reste du même côté que le corps cellulaire. Les régions cibles du faisceau spinoréticulaire sont les noyaux gigantocellulaire et réticulaire latéral qui reçoivent des fibres issues de la corne antérieure, et une partie très caudale, dénommée chez le rat « *subnucleus reticularis dorsalis* » qui reçoit des fibres issues des couches I et V de Rexed.

c- Autres faisceaux

Faisceaux spino (ponto) mésencéphaliques

Se projettent essentiellement sur deux structures du tronc cérébral : la substance grise périaqueducule et l'aire parabrachiale, située dans la région dorsolatérale du pont.

Faisceau spinosolitaire

Il est issu des couches I, V, VII, VIII et X de Rexed. Le noyau du tractus solitaire reçoit de nombreuses afférences vagues et pourrait donc être un site privilégié d'élaboration des réactions neurovégétatives accompagnant la perception douloureuse.

Faisceau spino-cervico-thalamique de Morin.

Fibres post synaptiques des cordons postérieurs.

2.1.3. Structures supraspinales impliquées dans la nociception

a- Formation réticulée bulbaire

La formation réticulée bulbaire correspond à une zone de contrôle et d'interaction de multiples systèmes, principalement la vigilance, la respiration, la régulation cardiovasculaire, la motricité et la nociception. La plupart des neurones de cette structure sont activés par différentes modalités sensorielles, notamment nociceptives, visuelles et auditives, si bien que cette région constitue très probablement une interface entre différents systèmes (Guirimand and Le Bars 1996).

La nociception viscérale est bien schématisée au niveau du tronc cérébral. Ainsi, l'anesthésie provoque une stimulation du noyau réticulé latéral surtout dans sa partie frontale. La distension colorectale provoque une stimulation des 2 noyaux réticulés dorsal et ventral. Une péritonite provoque la stimulation des noyaux réticulés supéro-latéral et latéro-central et du noyau d'Edinger-Westphal (Lanteri-Minet, Isnardon et al. 1993) (Figure 7).

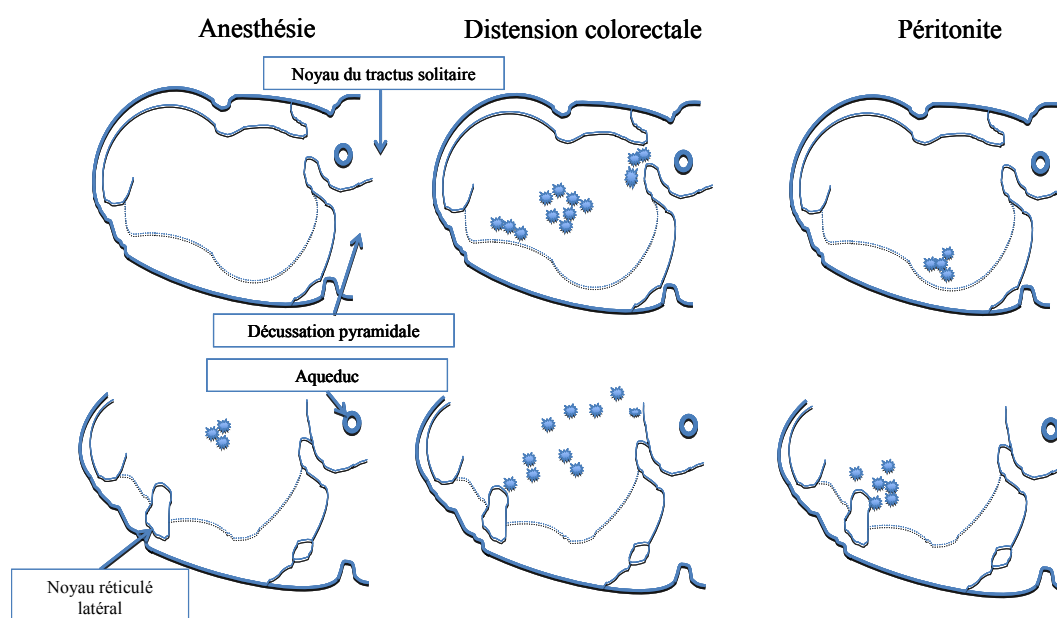


Figure 7- Schéma de l'expression de c-Fos dans le tronc cérébral après une anesthésie générale par voie inhalatrice, une distension colorectale et une péritonite chez le rat. L'anesthésie provoque une apparition de noyaux exprimant c-Fos surtout dans le plan frontal passant par le noyau réticulé latéral. La distension colorectale provoque une apparition de noyaux exprimant c-Fos entre les 2 noyaux réticulés dorsal et ventral. Une péritonite provoque l'apparition de c-Fos surtout dans les noyaux réticulés supéro-latéral et latéro-central et dans le noyau d'Edinger-Westphal (Lanteri-Minet, Isnardon et al. 1993)

b- Les projections au niveau du relais ponto-mésencéphalique, des structures thalamiques et du cortex cérébral ne sont pas détaillées car ne font pas l'objet de nos travaux.

2.2. Le nerf vague et son rôle dans la transmission de la nociception

Le nerf vague, également appelé nerf pneumogastrique est le dixième nerf crânien. C'est un nerf mixte qui convoie des informations motrices, sensibles, sensorielles, végétatives parasympathiques et joue également un rôle important dans la thermorégulation et la communication entre le cerveau et le système immunitaire (Grundy 2002).

2.2.1. Anatomie du nerf vague

Au niveau de la région cervicale, les 2 nerfs vagues droit et gauche sortent par les trous jugulaires. Ils suivent les 2 carotides jusqu'aux ganglions noueux où se trouvent les corps cellulaires des neurones sensoriels. Les premières branches quittent le nerf vague cervical au niveau du ganglion jugulaire pour donner les branches méningées et auriculaires. Ces 2 branches innervent respectivement la peau du méat acoustique et la dure mère de la fosse postérieure. Des branches pharyngées prennent naissance au niveau du ganglion noueux. Le nerf laryngé supérieur passe derrière la carotide et innerve le larynx, la partie caudale du larynx et l'œsophage proximal. Le nerf cervical cardiaque prend naissance le plus souvent du nerf vague cervical mais parfois du nerf laryngé supérieur. Ce nerf reçoit des afférences des barorécepteurs de la crosse de l'aorte ; pour cela il est également appelé « la branche aortique » ou le « nerf dépresseur ». Le nerf récurrent quitte le vague au niveau de l'artère sous clavière à droite et de la crosse de l'aorte à gauche, tourne autour de ces deux vaisseaux puis remonte entre l'œsophage et la trachée qu'il innerve sur son passage. Dans le médiastin supérieur, des branches nerveuses provenant du nerf vague innervent les bronches souches, les poumons et le cœur. Au niveau du diaphragme, les nerfs vagues gauche et droit passent dans la cavité abdominale associés à l'œsophage pour donner respectivement le tronc vagal antérieur et postérieur.

Au niveau thoracique et abdominal, il existe des branches qui communiquent entre les 2 nerfs vagues droit et gauche. Chez le rat, 9 à 30% des axones afférents se projettent du côté controlatéral. Il n'y a pas de preuve formelle que les axones efférents passent du côté controlatéral (Sauter, Niiijima et al. 1983; Horn and Friedman 2005).

a- Nerf vague abdominal

La répartition nerveuse abdominale du nerf vague chez le rat est bien connue. Il existe une grande similitude dans l'innervation des organes abdominaux entre les différentes espèces, et notamment entre le rat et l'homme.

Le tronc antérieur (la continuité du vague gauche) se divise pour donner la branche hépatique commune, le gastrique ventral et le cœliaque ventral (ou accessoire).

Chez le rat, il existe 11000 fibres nerveuses dans chacun des 2 troncs sous diaphragmatiques, 8000 fibres afférentes et 3000 efférentes. Moins de 1% des fibres nerveuses sont myélinisées et le diamètre moyen des fibres amyélinisées est de 0,8 μm et les plus fines font 0,1 μm .

La branche hépatique commune semble être la plus importante dans l'interaction entre le cerveau et le système immunitaire ainsi que dans la thermorégulation. La branche hépatique commune contient 3000 fibres nerveuses dont 2200 afférentes, 200 efférentes et 600 adventitielles (Prechtl and Powley 1990). La branche hépatique commune est nommée ainsi à tort. En effet, la majorité des afférences provenant de cette branche innervent le pylore, l'antrum, le pancréas et le duodénum proximal et seulement une minorité innervent le foie (Berthoud and Powley 1992; Phillips, Baronowsky et al. 1997).

La branche gastrique ventrale ou antérieure innervent la partie ventrale de l'estomac, le muscle circulaire du sphincter du pylore et le duodénum proximal. La branche gastrique postérieure pénètre dans l'estomac par sa partie postérieure à proximité de l'artère gastrique gauche, elle innervent également le duodénum proximal par les fibres

transpyloriques.

Les deux branches coeliaques se rejoignent à l'origine de l'artère gastrique gauche, suivent le trajet de l'artère coeliaque jusqu'au ganglion coeliaque puis innervent aussi bien l'intestin grêle que le colon (Tableau 3).

Tableau 3- Tableau récapitulatif des différentes branches abdominales du nerf vague et les organes qu'elles innervent

Troncs du nerf vague	Branches nerveuses	Organes innervés
Tronc antérieur (vague gauche)	Branche hépatique commune	Pylore Antre Pancréas Duodénum proximal Foie
	Branche gastrique ventrale	Face ventrale de l'estomac Sphincter du pylore Duodénum proximal
	Branche coeliaque ventrale ou accessoire	Intestin grêle et colon
Tronc postérieur (vague droit)	Gastrique postérieure	Face dorsale de l'estomac Pylore Duodénum proximal
	Branche coeliaque postérieure	Intestin grêle et colon

b- Organes innervés par le nerf vague

- Voies respiratoires :

La trachée, les bronches et les poumons reçoivent des afférences vagues provenant du ganglion jugulaire et du ganglion noueux.

- Cœur et aorte :

Les afférences vagales sont de trois types en fonction du tissu innervé (Cheng, Powley et al. 1997) :

des terminaisons variqueuses dans l'épicarde,
des terminaisons simples au niveau du myocarde,
des terminaisons plus complexes au niveau de l'endocarde.

Ces terminaisons complexes sont également retrouvées au niveau de la crosse de l'aorte et de la jugulaire suggérant un rôle de mécano et de chimiorécepteurs.

Le glomus carotidien est également innervé par des para ganglions associés au nerf laryngé.

- Para ganglions du nerf vague :

Les para ganglions sont des groupes de cellules nerveuses (glomus et neurones) répartis tout le long du nerf vague thoracique et abdominal. Un grand nombre de para ganglions est situé dans le hile hépatique, le long de la branche vagale hépatique commune jusqu'à sa bifurcation, dans le pancréas et constituent le plexus nerveux péri artériel de l'artère coeliaque. Les para ganglions les plus volumineux sont encapsulés et les plus petits se trouvent à l'intérieur de la fibre nerveuse. 90% des afférences para ganglionnaires sont vagales et les 10% restantes proviennent probablement du ganglion dorsal. Les cellules para ganglionnaires sécrètent des catécholamines.

- Foie, veine porte et voies biliaires :

Les terminaisons nerveuses afférentes vagales innervent le tissu conjonctif intra hépatique, les voies biliaires intra et extra hépatiques, la veine porte et les para ganglions du hile hépatique. L'innervation des structures hépatiques provient de la branche hépatique commune du nerf vague dont les bifurcations suivent celles de l'artère hépatique.

Le tissu conjonctif intra hépatique est innervé de façon différente selon l'espèce animale : l'innervation est importante chez l'être humain, le singe et le cochon d'inde mais très pauvre chez le rat (Forssmann and Ito 1977; Metz and Forssmann 1980;

Iwai, Miyashita et al. 1991; Tiniakos, Lee et al. 1996).

L'innervation des voies biliaires intra et extra hépatiques est très dense. Les terminaisons nerveuses du nerf vague vont jusqu'à l'adventice et la media de la paroi de la veine porte.

- Tube digestif :

Dans l'estomac, il a été décrit 3 types de terminaisons nerveuses vagales selon leur localisation : dans la musculuse, dans le plexus mésentérique ou dans la muqueuse (Figure 2). Les structures nerveuses terminales dans les muscles longitudinaux et circulaires sont des axones qui sont parallèles aux couches tissulaires. Ces axones sont connectés entre eux par des connexions qui sortent de façon perpendiculaire au trajet initial. Ces terminaisons sont plus fréquentes dans les couches musculaires longitudinales et sont plus denses dans le fundus.

Le type de terminaisons nerveuses vagales le plus fréquent est de loin la terminaison intra ganglionnaire (dans un ganglion mésentérique) où elles entrent en contact avec des neurones du plexus mésentérique (Berthoud, Patterson et al. 1997). Ces structures sont considérées comme des mécanorécepteurs donc stimulées lors d'une manipulation intestinale mais peuvent également jouer un rôle dans la chimioréception (Zagorodnyuk and Brookes 2000).

Dans la muqueuse gastrique, les afférences vagales sont peu abondantes. Elles jouent surtout un rôle dans la mécanoréception.

Il existe une relation étroite entre les mastocytes de la muqueuse intestinale et les terminaisons nerveuses vagales (Berthoud and Patterson 1996; Williams, Berthoud et al. 1997). Cette relation laisse supposer une activité paracrine du nerf vague dans la paroi intestinale.

- Autres organes innervés par le nerf vague :

Des terminaisons nerveuses vagues efférentes ont été décrites dans l'utérus, le pancréas, les glandes surrénales, le ganglion coeliaque et les ganglions du plexus solaire de l'animal (Neuhuber 1989; Berthoud and Powley 1993; Collins, Lin et al. 1999).

2.2.2. Rôle du nerf vague dans la nociception

Le nerf vague joue un rôle majeur dans la chimioréception, l'osmoréception, la thermoréception et la mécanoréception. Il est largement admis que le nerf vague joue un rôle primordial dans la perception affective et émotionnelle et un rôle moins prononcé dans la perception discriminative de la douleur (Traub, Sengupta et al. 1996). De plus, il existe dans la littérature des éléments en faveur d'un rôle du nerf vague dans la nociception. Ainsi, une dilatation gastrique entraîne une stimulation des afférences vagues chez le rat (Euchner-Wamser, Sengupta et al. 1993). Des stimulations d'étirement, d'écrasement ou de brûlure des voies aériennes stimulent également le nerf vague (Guz 1977). Lors d'une ischémie myocardique, il a été démontré que les afférences vagues cardiaques exprimaient les récepteurs A1 de l'adénosine. Ces récepteurs transmettent la douleur induite par l'ischémie myocardique (Middlekauff, Rivkees et al. 1998).

De point de vue anatomique, les afférences du nerf vague qui proviennent du système respiratoire et du système digestif haut se terminent dans le noyau para trigéminale impliqué dans la nociception (Saxon and Hopkins 1998). D'autre part, le faisceau spinothalamique dans sa partie cervicale est activé suite à une stimulation électrique du nerf vague (Chandler, Zhang et al. 1996). Des études ont également mis en évidence la présence de projections vagues primaires au niveau de la moelle épinière cervicale (McNeill, Chandler et al. 1991). Il a été également démontré que les afférences vagues, par la voie spinobulbaire, exerçaient un effet modulateur (inhibiteur ou stimulateur) sur la transmission nociceptive spinale (Ammons, Blair et al. 1983; Hummel, Sengupta et al. 1997). L'ensemble de ces informations est en faveur d'un effet modulateur du nerf vague sur les voies médullaires de la nociception.

De plus, il existe un effet modulateur exercé par le tronc coeliaque sur l'hyperalgésie induite au niveau du genou du rat (Miao, Janig et al. 1994; Miao, Janig et al. 1997; Khasar, Miao et al. 1998). L'hyperalgésie induite par le LPS et l'IL-1 β par injection intra péritonéale dépend également de l'intégrité du nerf vague particulièrement de sa branche hépatique commune (Watkins, Wiertelak et al. 1994a; Watkins, Wiertelak et al. 1994b).

2.2.3. Projections centrales du nerf vague

Les afférences du nerf vague se projettent surtout dans le noyau du tractus solitaire et l'area postrema. Cependant, quelques projections se trouvent également dans le noyau moteur dorsal du vague et dans le noyau du trijumeau.

Les projections qui proviennent du cœur et des poumons se projettent dans le noyau du tractus solitaire (partie latérale).

Les projections qui correspondent au tube digestif se trouvent au niveau du noyau du tractus solitaire (partie médiane), dans l'area postrema et dans le noyau moteur dorsal. La topographie viscérale du tube digestif est caractérisée par une projection rostrocaudale. Ainsi, les projections qui proviennent de la langue sont rostrales et celles qui proviennent des intestins sont caudales (Norgren and Smith 1988; Altschuler, Bao et al. 1989). Cette topographie permet d'avoir un schéma facile de la projection viscérale au niveau central mais ne permet pas une étude sensorielle et fonctionnelle spécifique à chaque portion du tube digestif.

Le troisième relai axononeuronal se trouve au niveau :

des noyaux médullaires moteurs comme le noyau moteur dorsal du nerf vague, le noyau ambigu et les noyaux de la zone réticulaire ;

des noyaux parabrachiaux

des différentes parties de l'hypothalamus, des amygdales, de la strie laminaire et du cortex insulaire.

Cette distribution centrale des afférences du nerf vague implique qu'un signal généré par le nerf vague possède le potentiel d'affecter le corps entier. De plus, les projections du nerf vague au niveau paraventriculaire impliquent un rôle dans les réflexes vagovagal et spinovagal et donc dans l'homéostasie du corps (Geerling, Shin et al. 2010).

2.2.4. Neurotransmetteurs utilisés par le nerf vague

Le glutamate est considéré comme le neurotransmetteur principal des neurones afférents primaires aussi bien au niveau des nerfs crâniens qu'au niveau des nerfs spinaux (Persson and Broman 2004). Seule la forme lévogyre (L) du glutamate traverse la barrière hématoencéphalique. Il a été démontré que le L-glutamate jouait un rôle aussi bien dans les afférences vagales cardiovasculaires que digestives (Talman and Colombari 1995). Le rôle du L-glutamate a largement été étudié dans les neurones afférents vagues nociceptifs, baroréceptifs, gustatifs et gastrointestinaux (Lawrence and Jarrott 1994; Li and Smith 1997; Berthoud and Neuhuber 2000; Berthoud, Earle et al. 2001; Furukawa, Hatano et al. 2001). Les terminaisons vagales glutamatergiques du noyau solitaire sont modulées par P2X et TRPV1 (Jin, Bailey et al. 2004). Le glutamate sécrété par les afférences vagales provoque la sécrétion du GABA (*Gamma AminoButyric Acid*) au niveau des neurones nucléaires. Le L-glutamate agit par l'intermédiaire des récepteurs NMDA (*N-méthyl-D-aspartic acid*) ioniques ou non ioniques ou des récepteurs canaux ioniques non NMDA.

Des peptides comme la CGRP et la substance P ont également été retrouvés dans les neurones vagues nucléaires afférents.

2.2.5. Rôle anti inflammatoire du nerf vague

Les fibres nerveuses efférentes du nerf vague innervent plusieurs organes impliqués dans la réponse immunitaire comme le foie, le cœur et le tube digestif. L'acétylcholine agit par l'intermédiaire des récepteurs alpha 7 nicotiques qui inhibent le facteur nucléaire NFkB (*Nuclear factor kappa B*) et donc la synthèse et la libération de cytokines pro inflammatoires (Rosas-Ballina, Goldstein et al. 2009)

(Figure 8). Le rôle anti inflammatoire du nerf vague dans le sepsis reste controversé en fonction du modèle expérimental utilisé. Ce rôle anti inflammatoire est bien mis en évidence lors d'une péritonite (van Westerloo, Giebelen et al. 2005) et moins évident à prouver dans les autres modèles de sepsis (Wang, Xing et al. 2011).

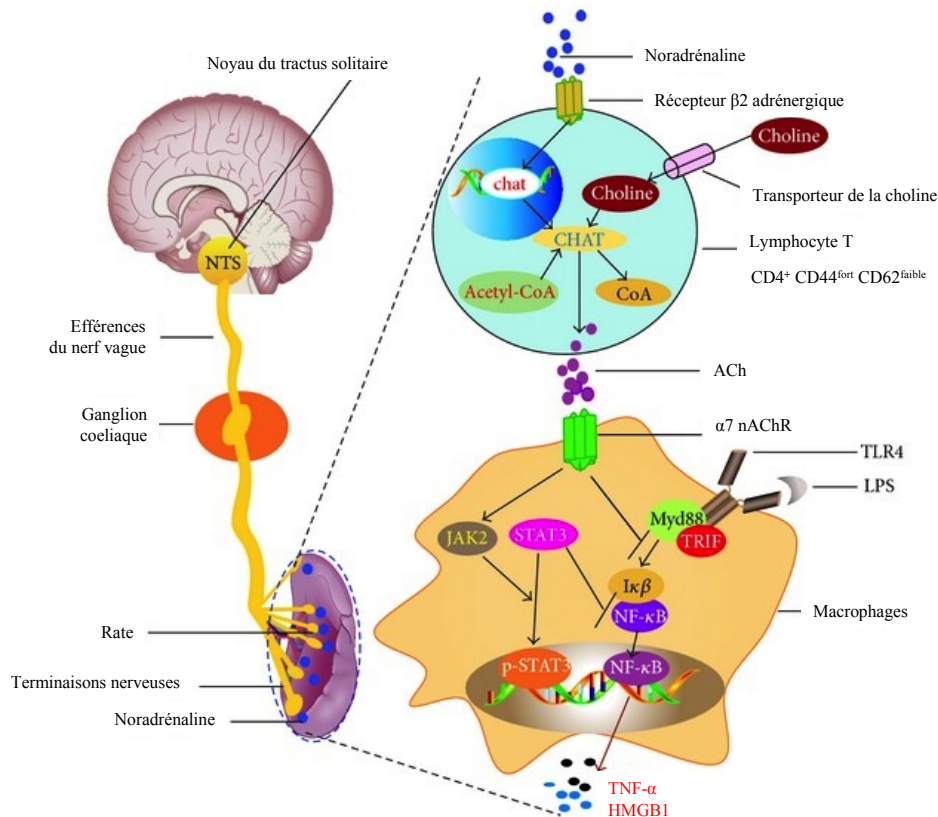


Figure 8- Mécanismes anti inflammatoires de l'effet cholinergique. Au niveau de la rate, la noradrénaline agit sur les récepteurs $\beta 2$ adrénergiques des lymphocytes T en stimulant la synthèse de l'acétylcholine (ACh) par activation de la choline acétyl-transférase (ChAT). L'ACh sécrétée par les lymphocytes T favorise l'expression et agit sur les récepteurs nicotiniques $\alpha 7$ de l'ACh ($\alpha 7$ nAChR) pour stimuler la phosphorylation de STAT3 et inhiber le NF κ B. L'inhibition de NF κ B entraîne une diminution de la production de cytokines pro inflammatoires comme celle du TNF- α et de HMGB1 (*High Mobility Group Box 1*) (Andersson and Tracey 2012)

3. Système endocrinien et immunitaire intestinal

Des centaines de milliers de cellules endocrines sécrètent une vingtaine d'hormones dans le tube digestif. La plupart de ces cellules endocrines se trouvent au niveau des villosités intestinales. Les cellules endocrines sont alors en contact direct avec le contenu de la lumière intestinale. Elles libèrent, en fonction du contenu de la lumière intestinale, des hormones qui sont en contact direct avec les terminaisons

nerveuses, les cellules immunitaires et les vaisseaux sanguins.

Le tube digestif joue un rôle essentiel dans l'immunité du corps humain. Ainsi, 70 à 80% des cellules immunitaires se trouvent au niveau du tube digestif (Castro and Arntzen 1993).

Lorsque les cellules épithéliales du tube digestif sont endommagées, des substances neuroactives comme la bradykinine, la 5-HT et les tachykinines sont sécrétées et entraînent des modifications importantes au niveau des terminaisons nerveuses du tube digestif.

Les médiateurs de l'inflammation sécrétés par les cellules endothéliales et les cellules immunitaires provoquent la sécrétion de facteurs neurotrophiques tels que le NGF (*Nerve Growth Factor*). Ces facteurs neurotrophiques sont sécrétés par les fibroblastes et agissent sur les neurones spinaux afférents en les stimulant (Castro and Arntzen 1993; Van Assche, Barbara et al. 1999).

Les pathologies de la muqueuse intestinale ne font pas partie de nos travaux. Notre centre d'intérêt est l'inflammation de la cavité abdominale dans un contexte de chirurgie abdominale. L'influence des modifications endothéliales dans ce contexte est limitée. Ainsi, nous nous contentons de cette description très brève des modifications endothéliales et de leurs influences sur la transmission de la nociception vers le SNC.

4. SNC et immunomodulation

La littérature met en évidence plusieurs interactions entre le SNC, le SNA (sympathique et parasympathique), le système endocrinien et le système immunitaire (Teeling, Felton et al. 2007; Thayer and Sternberg 2010).

Les neurohormones sécrétées dans la circulation sanguine (cortisol et catécholamines) entraînent une régulation de l'immunité systémique par une liaison directe entre la neurohormone et la cellule immunitaire ; alors que la régulation de l'immunité par voie neuronale se fait d'une façon localisée et est donc liée à une zone

anatomique (Tracey 2002; Sternberg 2006) (Figure 9).

En plus du système hormonal, la voie neuronale des deux systèmes nerveux sympathique (SNS) et parasympathique (SNPS) joue un rôle crucial dans l'immunomodulation. Le système immunitaire permet (1) une protection innée « non spécifique » du soi et (2) une protection adaptative « spécifique » du soi assurée d'une part, par le thymus et les ganglions lymphatiques qui régulent l'immunité cellulaire et d'autre part, par la moelle osseuse et la rate qui régulent l'immunité humorale.

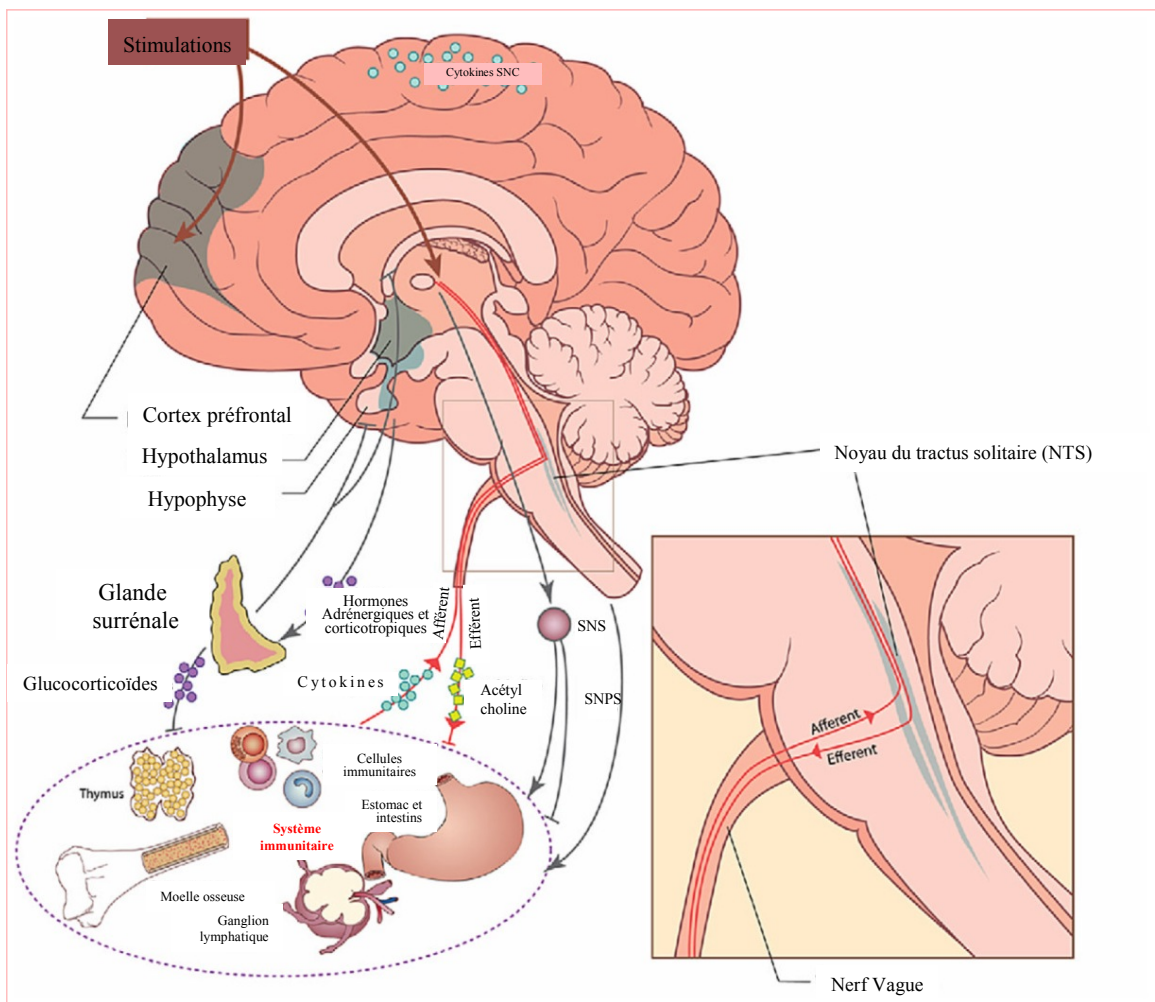


Figure 9- Schéma montrant la relation entre le nerf vague et ses projections au niveau du SNC avec les systèmes endocrinien et immunitaire (Thayer and Sternberg 2010)

La relation entre le système immunitaire et le système nerveux commence par l'innervation des organes lymphoïdes centraux et périphériques. Ainsi, le SNS module l'immunité régionale en innervant la rate, les ganglions lymphatiques et le thymus

(Nance and Sanders 2007; Thayer and Sternberg 2010). Cependant, le SNPS participe également à l'innervation de ces organes et joue donc un rôle dans la modulation du système immunitaire (Felten, Felten et al. 1985; Nance, Hopkins et al. 1987; Nance and Sanders 2007; Trotter, Stornetta et al. 2007; Buijs, van der Vliet et al. 2008).

Le rôle du SNPS dans l'immunomodulation est toutefois controversé dans la littérature (Sternberg 2006; Huston, Gallowitsch-Puerta et al. 2007; Nance and Sanders 2007; van der Zanden, Hilbers et al. 2009). Ainsi, la position anatomique du noyau solitaire fait que le nerf vague est considéré comme le système d'alarme précoce dans la détection des pathogènes comme par exemple les bactéries. Il exerce également un effet inhibiteur sur le système immunitaire après l'élimination du pathogène afin d'empêcher l'exacerbation vers une réponse immune systémique (Berthoud and Neuhuber 2000).

Plusieurs études menées chez l'animal et l'être humain ont montré l'implication du SNC dans l'immunomodulation (Goehler, Gaykema et al. 2000; Ohira, Fukuyama et al. 2009). En effet, les afférences du nerf vague après un passage par le noyau du tractus solitaire se projettent au niveau du noyau parabrachial du thalamus, du noyau paraventriculaire, des noyaux centraux de l'amygdale, du cortex insulaire, du cortex cingulaire antérieur et du cortex préfrontal médian (Ter Horst and Postema 1997; Thayer and Lane 2009). Des études neuroradiologiques humaines ont mis en évidence l'importance du cortex insulaire, du cortex cingulaire antérieur et du cortex préfrontal médian dans l'immunomodulation (Ohira, Fukuyama et al. 2009).

En résumé, lors d'une inflammation péritonéale aiguë, le nerf vague et le SNPS exercent un effet anti inflammatoire tandis que les nerfs spinaux et le SNS exercent un effet pro inflammatoire (Figure 3 et Tableau 2). L'équilibre entre ces deux effets orientera l'étendue de l'inflammation. En effet, si cet équilibre est en faveur d'un effet anti inflammatoire, l'inflammation restera localisée dans le péritoine et s'il est en faveur d'un effet pro inflammatoire, l'inflammation se généralisera en affectant le corps entier.

5. Modulateurs de la douleur viscérale

5.1. Canaux sodiques voltage dépendants

Les canaux sodiques voltage dépendants jouent un rôle primordial dans l'augmentation rapide du potentiel d'action des cellules nerveuses afférentes. Le seuil de dépolarisation et le temps de repolarisation des canaux sodiques sont deux facteurs déterminants dans la dépolarisation neuronale.

Les canaux sodiques présents sur les neurones sensoriels viscéraux sont classés en deux groupes selon leur sensibilité à la tétrodotoxine (TTX) (Waxman, Cummins et al. 1999). Ainsi, les canaux Nav 1,7 sont sensibles et les canaux Nav 1,8 et Nav 1,9 sont résistants à la TTX

Les canaux Nav 1,7, 1,8 et 1,9 sont tous les trois exprimés par les neurones des ganglions dorsaux qui correspondent à des projections coliques (King, Macleod et al. 2009). Nav 1,8 et 1,9 sont également retrouvés dans les ganglions dorsaux correspondant à des projections vésicales (Matsumoto, Yoshida et al. 2007).

5.2. Canaux potassiques voltage dépendants

Les canaux potassiques jouent un rôle important dans l'excitabilité des neurones viscéraux afférents. Ils contribuent à la repolarisation des membranes cellulaires et limitent les dépolarisations répétitives. Deux types de canaux potassiques sont décrits :

- les canaux I_A sont plus faciles à dépolariser avec un seuil de dépolarisation bas.
- Les canaux I_K sont plus difficiles à dépolariser avec un seuil de dépolarisation plus élevé.

Les canaux I_A et I_K sont des régulateurs de l'excitabilité des neurones sensitifs viscéraux. Une diminution (par régulation négative ou inhibition) de l'activité des canaux I_A au niveau de la membrane cellulaire des neurones sensitifs viscéraux entraîne un état d'hyperstimulation cellulaire avec des décharges cellulaires répétitives (Xu, Winston et al. 2006). D'autre part, une diminution de l'activité des canaux I_K

entraîne un élargissement du potentiel d'action des neurones sensitifs viscéraux.

5.3. Modulateurs pharmacologiques de l'excitabilité neuronale

Les afférences viscérales répondent à une variété de ligands endogènes ou exogènes. Ces ligands peuvent activer les canaux ioniques ou se lier à des récepteurs.

5.3.1. Canaux ioniques liés à un ligand

L'activation du canal ionique se fait par la liaison du ligand sur son récepteur ce qui provoque une ouverture du canal ionique et donc une dépolarisation de la membrane cellulaire.

Les canaux TRP (*Transient Receptor Potential*) regroupent plusieurs types de canaux : les canaux vaniloïdes TRPV (*Transient Receptor Potential Vanilloid*), les TRPC (*Transient Receptor Potential Canonical*), les TRPA (*Transient receptor Potential Ankyrin*), les TRPM (*Transient Receptor Potential Melastatin*) et les TRPP (*Transient Receptor Potential Polycystin*).

TRPV1 et TRPV4 sont les plus étudiés dans les afférences de la douleur viscérale. TRPV1 est le récepteur de la capsaïcine mais répond également à plusieurs stimuli comme la température, l'acide et la distension mécanique. Il est retrouvé dans les intestins, l'estomac, le colon et la vessie (Rong, Hillsley et al. 2004; Daly, Rong et al. 2007; Bielefeldt and Davis 2008).

TRPV4 est un canal mécanosensible mais peut être stimulé également par la température. TRPV4 est présent dans le colon et le tube digestif haut (Brierley, Page et al. 2008).

Ces canaux peuvent être modulés par l'activation d'autres récepteurs comme les PARs (*Protease Activated Receptor*) (Sipe, Brierley et al. 2008).

5.3.2. Récepteurs P2X (récepteurs de l'ATP)

En plus de son rôle de donneur d'énergie libre, l'ATP joue un rôle dans la signalisation extracellulaire. L'ATP agit sur deux types de récepteurs : (1) les récepteurs P2Y qui sont couplés à la protéine G et (2) les récepteurs P2X qui sont des canaux liés à un ligand (l'ATP).

Les récepteurs P2X ont été observés dans les neurones afférents du colon, de l'estomac, de l'intestin grêle et de la vessie (Kirkup, Booth et al. 1999; Castelucci, Robbins et al. 2003; Dang, Bielfeldt et al. 2005; Yu and de Groat 2008).

Les récepteurs P2X jouent un rôle dans la sensibilité mécanique du tube digestif et de la vessie (Cockayne, Dunn et al. 2005).

Les antagonistes des récepteurs P2X arrivent à neutraliser le phénomène de surexcitation qui est provoqué par l'inflammation (Rong, Keating et al. 2009).

5.3.3. Récepteurs 5HT₃ de la sérotonine

Les récepteurs 5HT₃ sont présents dans les nerfs afférents du colon et de l'intestin grêle (Hillsley and Grundy 1998; Hicks, Coldwell et al. 2002; Keating, Beyak et al. 2008).

Ils entraînent une augmentation de la transmission afférente qui est complètement inhibée par les antagonistes de la sérotonine.

L'importance de ces récepteurs réside dans l'utilisation des agonistes de la 5HT dans le traitement de la douleur viscérale et comme anti-émétique.

5.3.4. Récepteurs activés par la protéase PAR

Les PAR sont des récepteurs couplés à la protéine G. Ces récepteurs sont ubiquitaires et présentent une structure commune à sept hélices alpha

transmembranaires (Coelho, Ossovskaya et al. 2003).

Le représentant principal des PARs viscéraux est le PAR₂. Ses ligands endogènes sont des protéases incluant la trypsine et la tryptase.

L'activation des PARs provoque une dépolarisation des cellules nerveuses afférentes aussi bien sur du tissu *in vivo* que sur des cellules isolées (Kirkup, Jiang et al. 2003; Kayssi, Amadesi et al. 2007). Les PARs inhibent les canaux potassiques voltage dépendants dont surtout les canaux I_K à plus de 50% (Kayssi, Amadesi et al. 2007). PAR₂ est également capable d'activer TRPV1 et TRPV4 (Sipe, Brierley et al. 2008). L'excitabilité des PAR₂ dans les ganglions dorsaux passe par la voie des phosphokinases et par la voie ERK.

D'autres modulateurs dont le rôle est moins connu interviennent tels que les récepteurs glutamatergiques métabotropiques (mGluR) ou *Metabotropic Glutamate Receptor*, la somatostatine, le GABA_B, les hormones rassasiantes, le NO et le H₂S.

5.4. Nociception et sensibilisation périphérique

Suite à une stimulation nociceptive, plusieurs phénomènes d'hypersensibilité sont susceptibles d'être observés et se traduisent par : (1) une réduction du seuil de la stimulation douloureuse (allodynie), (2) une réponse douloureuse exagérée à une stimulation non douloureuse (hyperalgésie), (3) l'apparition d'une activité douloureuse persistante ou spontanée surtout suite à une stimulation prolongée et (4) une extension du champ douloureux à une zone saine non atteinte initialement par la stimulation nociceptive (hyperalgésie secondaire) (Chiu, von Hehn et al. 2012). Ces phénomènes sont dus à des changements au niveau des SN périphérique et central.

Ainsi, après une stimulation nociceptive périphérique (microbienne, inflammatoire ou douloureuse), il apparaît au niveau des terminaisons nerveuses une augmentation de l'expression et une activation de 3 types de récepteurs : (1) une augmentation de l'expression des récepteurs de cytokines notamment d'IL-1 β et de TNF. Ces

récepteurs cytokiniques stimulés par la cytokine correspondante activent les MAP kinases et augmentent donc l'excitabilité des membranes cellulaires (Janeway and Medzhitov 1998; Zhang and Dougherty 2011). (2) Une augmentation de l'expression des récepteurs signalant le danger DSR (*Danger Signal Receptors*) comme les canaux TRP, P2X ainsi que les récepteurs de la DAMP (*Danger-Associated Molecular Pattern*) (Cockayne, Hamilton et al. 2000; Bianchi 2007). Ces récepteurs reconnaissent aussi bien les signaux exogènes environnementaux comme la température ou l'acidité que les signaux de danger endogènes qui apparaissent suite à une lésion tissulaire comme l'ATP et l'acide urique. (3) Une augmentation de l'expression des PRR (*Pattern Recognition Receptors*) comme les TLR et les NLR. Ces récepteurs reconnaissent des motifs moléculaires associés à une infection virale ou bactérienne, les PAMP (Liu, Xu et al. 2010; Qi, Buzas et al. 2011) (Figure 10).

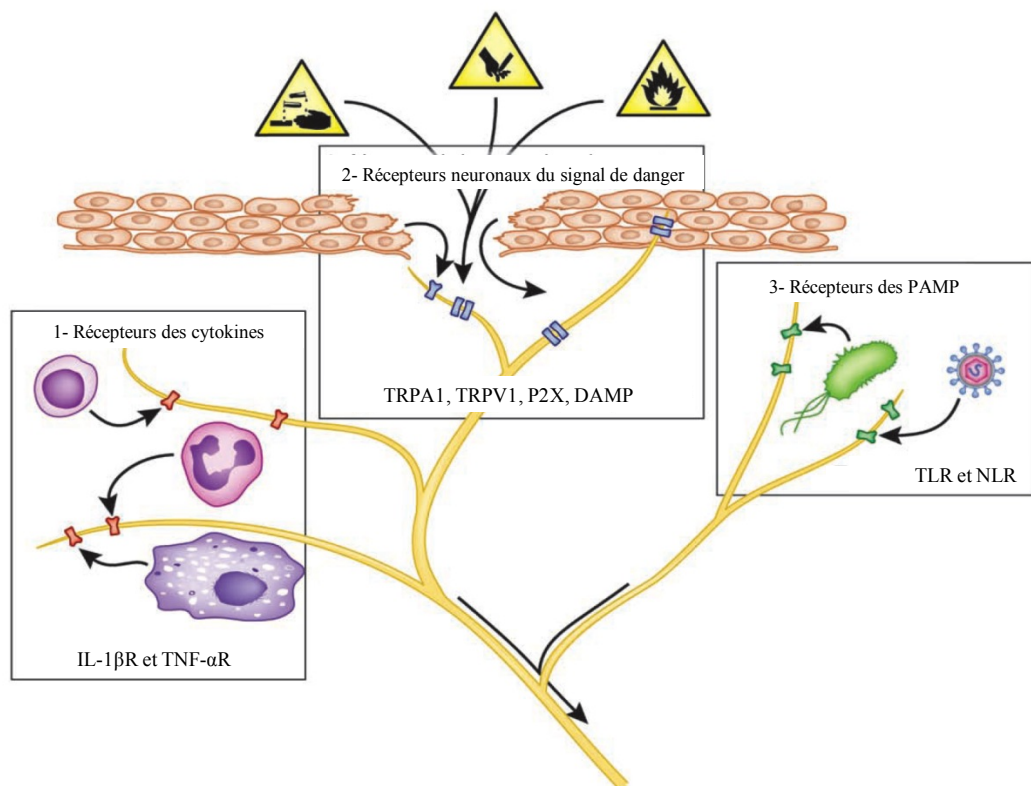


Figure 10- Hypersensibilité périphérique. Surexpression au niveau des terminaisons nerveuses des récepteurs de cytokines, des récepteurs de signaux de danger neuronaux et des récepteurs des PAMP ou PRR (Chiu, von Hehn et al. 2012)

L'ensemble de ces modifications nerveuses stimule la sécrétion de neuropeptides comme la SP et le CGRP mais aussi l'adrénomodulline, les neurokinines A et B, le VIP, le neuropeptide Y, le glutamate, le NO, le NGF, le GRP et la sérotonine. Ces neuropeptides favorisent une réaction inflammatoire périphérique en impliquant différents mécanismes : (1) un chimiotactisme et une activation des cellules immunitaires comme les polynucléaires neutrophiles, les macrophages, les lymphocytes et les mastocytes au niveau du tissu lésé, (2) une activation du tissu endothélial vasculaire qui entraîne une vasodilatation donc une facilitation dans le recrutement des cellules immunitaires et un œdème tissulaire et (3) une activation des cellules dendritiques qui vont stimuler les lymphocytes T (Figure 11).

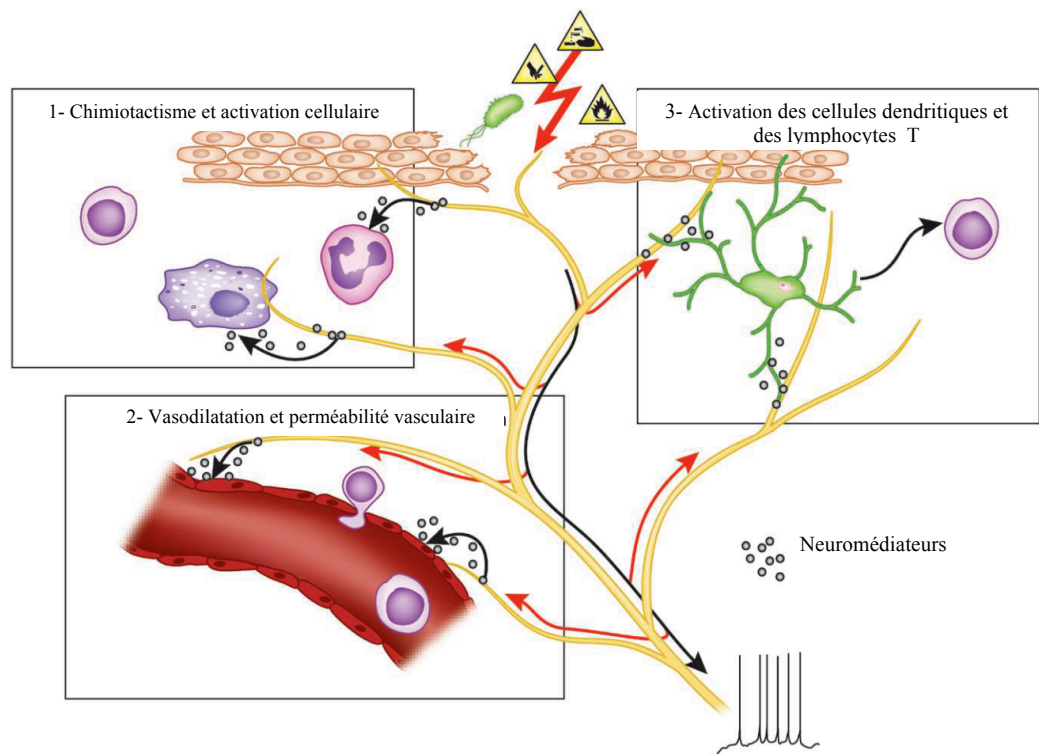


Figure 11- Hypersensibilité périphérique avec apparition d'un chimiotactisme, d'une vasodilatation et d'une activation des cellules dendritiques et des lymphocytes T (Chiu, von Hehn et al. 2012)

L'ensemble de ces réactions provoque une douleur dans une zone tissulaire déjà endommagée appelée la zone d'hyperalgésie primaire. Cette hyperalgésie primaire est associée à une sensibilité des fibres nerveuses C et A δ .

De plus, la stimulation du bout distal d'une racine nerveuse dorsale provoque une activation antidromique des fibres nerveuses dont une des conséquences est la libération par les terminaisons libres amyéliniques de neuropeptides notamment la SP et le CGRP, mais aussi l'adrénomodulline, les neurokinines A et B, le VIP, le neuropeptide Y, le glutamate, le NO, le NGF, le GRP et la sérotonine. Ces neuropeptides sont responsables d'une vasodilatation et d'une dégranulation des mastocytes. La libération de l'histamine qui en résulte, amplifie le processus vasculaire et sensibilise les nocicepteurs des terminaisons nerveuses impliquées initialement ou pas dans le processus inflammatoire. Ce phénomène représente l'inflammation neurogène (Le Bars, Villanueva et al. 1992).

Un autre phénomène connu d'amplification de la réponse nociceptive périphérique est appelé le réflexe d'axone. Il s'agit d'une sensibilisation des terminaisons nerveuses adjacentes ou non adjacentes à une lésion tissulaire par les médiateurs de la nociception qui passent de la périphérie vers le SNC mais aussi vers les racines nerveuses adjacentes par un réflexe d'axone.

Ces deux phénomènes (l'inflammation neurogène et le réflexe d'axone) entraînent l'extension de l'inflammation vers le tissu sain entourant la lésion. Nous parlons ainsi d'une hyperalgésie secondaire « en tache d'huile ». L'hyperalgésie secondaire est associée à une sensibilisation centrale de la corne postérieure de la moelle épinière.

Les médiateurs chimiques libérés au cours du processus inflammatoire se lient aux récepteurs spécifiques ainsi qu'aux canaux ioniques de la terminaison périphérique du neurone primaire. De nombreuses cascades de signalisation sont ainsi activées et entraînent une modulation immédiate de la transcription de molécules effectrices puis des modifications dans la transcription génique (Woolf 1996a).

Ainsi, la sensibilisation périphérique du message nociceptif apparue dès la périphérie se fait en deux temps. La sensibilisation initiale est probablement due aux prostaglandines et à la bradykinine qui changent la sensibilité des récepteurs et

réduisent le seuil d'activation des canaux ioniques. Les changements au long terme impliquent des modifications transcriptionnelles provoquées par les cytokines, les facteurs de croissance avec une production accrue de récepteurs, de canaux ioniques et de neuromédiateurs centraux.

5.5. Nociception et sensibilisation centrale

L'allodynie qui est l'abaissement du seuil de réponse à un stimulus mécanique normalement indolore existe aussi dans une zone dite d'« hyperalgésie secondaire » concernant un tissu non lésé autour du tissu lésé. Contrairement à la zone d'hyperalgésie primaire, il n'y a pas de modification du seuil du stimulus thermique. Des changements au niveau de la corne dorsale de la moelle à la suite de la lésion périphérique seraient à l'origine de ce phénomène. Il s'agit de la « sensibilisation centrale ». Il faut souligner que des mécanismes centraux et des mécanismes périphériques sont impliqués.

La corne dorsale de la moelle est le site de terminaison des neurones primaires afférents. C'est le lieu d'interactions complexes entre les fibres afférentes des neurones médullaires et des terminaisons des voies descendantes provenant du cerveau. La sensibilisation centrale est le reflet de la plasticité du SNC en réponse à un processus douloureux. Les propriétés de la réponse des neurones de la corne dorsale sont modifiées par cette stimulation nociceptive (Figure 12).

Ainsi, Mendell et al. ont démontré qu'un stimulus suffisamment douloureux pour activer les fibres C activait les neurones de la corne dorsale (Mendell., 1965). Durant cette stimulation, l'activité neuronale augmente progressivement avec la durée du stimulus. De ce fait, plus la durée de la stimulation est longue et plus l'intensité de l'activité neuronale est importante. Il ne s'agit donc pas d'une simple relation stimulus-réponse mais d'une exacerbation (« *wind-up* ») de l'activité neuronale médullaire qui augmente la sensibilité des neurones et participe à la sensibilisation centrale. Ce phénomène de « *wind-up* » ou sommation temporelle est fondamental dans la conceptualisation actuelle de la douleur. Ainsi, le rationnel ayant abouti au principe de l'analgésie préemptive repose sur la volonté de réduire le développement

de la douleur subaiguë en abolissant ou en diminuant la douleur aiguë et donc en prévenant les modifications médullaires associées au « *wind-up* » (Smith, Power et al. 1999).

La deuxième modification observée au niveau de la corne postérieure de la moelle épinière consiste en une augmentation de la taille de la région de réception. Ainsi, un neurone normalement en dehors de la région de réponse à un stimulus douloureux, répond à ce stimulus et des neurones non sensitifs sont recrutés pour répondre à une stimulation nociceptive (Woolf 1996b; Ikeda, Stark et al. 2006).

Un troisième mécanisme implique les neurones « sensibilisés » qui possèdent donc des seuils de réponse plus bas et une amplitude de réponse élevée (Woolf 1983; Cook, Woolf et al. 1987).

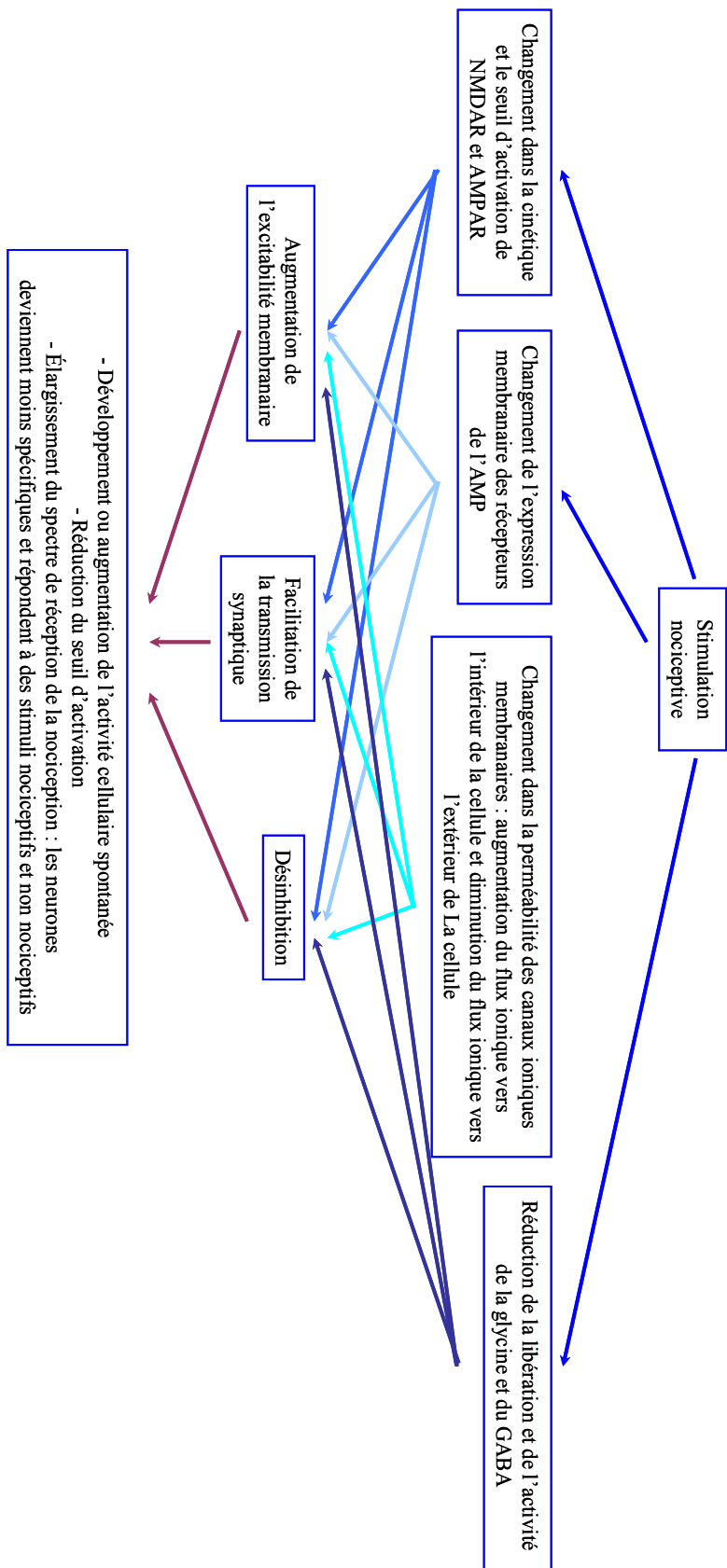


Figure 12- Le phénomène d'hypersensibilité centrale (Latremoliere and Woolf 2009)

Ainsi, un seuil d'activation abaissé se traduit par le fait qu'un stimulus normalement non douloureux active des neurones qui transmettent l'information nociceptive. Selon la célèbre théorie du portillon de Melzack et Wall ou « *gate control* », la stimulation sélective des afférences à gros calibre (fibres A β) recrute des interneurons inhibiteurs dans la substance gélatineuse des cornes postérieures de la moelle (Melzack and Wall 1965) (Figure 13). Les afférences nociceptives ont un contact excitateur avec les fibres afférentes de la moelle épinière ou les neurones nociceptifs secondaires. Les afférences nociceptives inhibent les interneurons inhibiteurs ce qui résulte en une facilitation du passage de l'influx nociceptif. De plus, les afférences nociceptives et non nociceptives peuvent activer les interneurons inhibiteurs et produire un effet inhibiteur localisé. Donc, une stimulation de basse intensité, comme celle appliquée lors de l'utilisation du TENS (stimulation électrique cutanée) ou du massage léger, produirait une analgésie locale par le recrutement du système spinal d'inhibition de la substance gélatineuse.

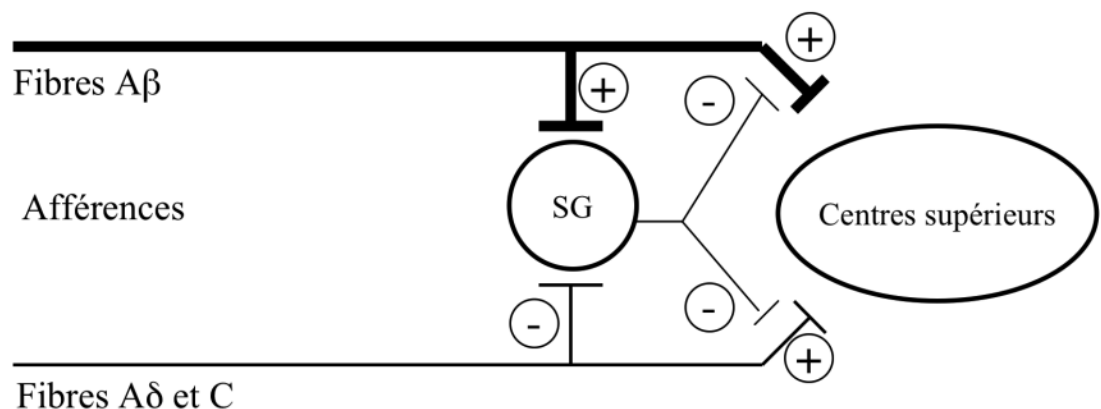


Figure 13- La théorie du portillon. Les fibres A δ et C transmettent la nociception et exercent un effet négatif sur les neurones inhibiteurs de la substance gélatineuse. Une stimulation des fibres A β provoque une stimulation des neurones inhibiteurs de la substance gélatineuse. Ces neurones inhibiteurs diminuent la transmission de la nociception par A δ et C et donc la perception de la douleur (Melzack and Wall 1965)

Un dernier mécanisme a été décrit et concerne la potentialisation à long terme ou LTP (*Long Term Potentiation*) (Randic, Jiang et al. 1993). Il s'agit d'un renforcement durable de l'efficacité de la transmission synaptique qui fait suite à certains types de stimulation. Ce mécanisme a été décrit initialement dans l'hippocampe puis dans la moelle épinière (Bliss and Lomo 1973; Randic, Jiang et al. 1993).

L'ensemble de ces mécanismes entraîne une sensibilisation centrale. Cette sensibilisation se traduit par une facilitation de la transmission nociceptive qui dure plus longtemps que la stimulation. Cette facilitation est entretenue par une auto stimulation neuronale ou une stimulation de faible intensité (Latremoliere and Woolf 2009). Le phénomène de facilitation est expliqué par (1) une augmentation de la disponibilité des excitateurs pré synaptiques (Woolf and King 1990), (2) une diminution du système inhibiteur (Moore, Kohno et al. 2002), (3) une augmentation de l'excitabilité membranaire neuronale (Sivilotti and Woolf 1994) et enfin (4) des changements au niveau de la microglie et des astrocytes (Chacur, Lambertz et al. 2009; Gao, Zhang et al. 2009; Hathway, Vega-Avelaira et al. 2009; Taves, Berta et al. 2013).

Du point de vue neurochimique, les principaux médiateurs candidats à un rôle dans les phénomènes de sensibilisation médullaire sont les acides aminés excitateurs, les cytokines, les facteurs de croissance et les seconds messagers intracellulaires tels que le NO et la protéine kinase C. Le rôle des récepteurs NMDA dans les phénomènes de sommation temporelle « *wind up* » est connu (Dickenson and Sullivan 1987; Woolf and Thompson 1991). Ils sont impliqués dans l'initiation et la maintenance de phénomènes de sensibilisation centrale ainsi que dans la LTP.

6. AL et douleur viscérale

Les AL sont des agents pharmacologiques qui bloquent de façon réversible la conduction nerveuse. Ils agissent par obstruction du port central du canal sodique auquel ils accèdent par la face cytoplasmique après avoir traversé la bicouche lipidique de la membrane cellulaire. En bloquant la transmission nerveuse au niveau du site de l'agression tissulaire, les AL peuvent, d'une part, atténuer l'inflammation d'origine neurogène (Coderre, Katz et al. 1993) et, d'autre part, exercer une activité anti inflammatoire propre (Hollmann and Durieux 2000). Les AL peuvent moduler la réponse inflammatoire post opératoire (Hollmann and Durieux 2000).

Plusieurs mécanismes d'action sont ainsi impliqués.

6.1. Action immunomodulatrice

L'action des AL sur le système immunitaire se traduit par un effet direct sur la mobilité des macrophages et une diminution des médiateurs de l'inflammation dans un contexte chirurgical. En effet, après une chirurgie colique, les AL entraînent une diminution de la sécrétion des cytokines (IL-6, IL-8, IL-1ra), du complément (C3a) et de la sous-unité α de l'intégrine dans la circulation sanguine (Herroeder, Pecher et al. 2007). Dans un modèle de péritonite septique chez le rat, Wang et al. ont démontré que la lidocaïne diminuait la concentration sérique de HMGB1 et inhibait donc l'expression de NF κ B (Wang, Xing et al. 2011). Il a été également démontré que dans des modèles d'inflammation non chirurgicaux, les AL diminuaient (1) la mobilité des macrophages (Dickstein, Kiremidjian-Schumacher et al. 1984), (2) la production de l'anion superoxyde par les polynucléaires neutrophiles (Hollmann, Herroeder et al. 2004) et (3) l'inflammation pulmonaire dans le syndrome de détresse respiratoire aigue (Piegeler, Dull et al. 2014). Les AL diminuent par voie inhalatoire l'inflammation des voies aériennes (da Costa, Olsen et al. 2007; Serra, Anjos-Valotta et al. 2012).

6.2. Action sur le système sympathique

Le rôle du système sympathique dans le développement d'une algodystrophie ou d'un « *complex regional pain syndrom* » est connu. Les AL administrés de façon continue par voie périnerveuse permet un soulagement complet de la douleur, une mobilisation rapide et une sortie de l'hôpital plus précoce des enfants souffrants d'algodystrophie (Dadure, Motais et al. 2005).

6.3. Effet inhibiteur des récepteurs couplés aux protéines G

Les AL exercent des effets inhibiteurs sur des récepteurs comme les récepteurs A2 du thromboxane, de l'acide lysophosphatidique et muscariniques. Il a été démontré plus spécifiquement que les AL à faibles concentrations (plus faibles que celles nécessaires pour inhiber les canaux sodiques) inhibaient spécifiquement la protéine G (Hollmann, Herroeder et al. 2004).

6.4. Effet direct sur les muscles intestinaux

Les AL exercent un effet direct sur les muscles intestinaux en diminuant le tonus des muscles circulaires des intestins lésés (Tappenbeck, Hoppe et al. 2013). Cet effet peut expliquer la reprise d'une activité intestinale précoce dans le cadre d'une chirurgie abdominale chez les sujets traités par des AL en comparaison aux sujets témoins non traités.

6.5. Action sur la transmission nerveuse nociceptive

Il a été démontré que les AL utilisés en périmerveux entraînaient une diminution du transport axonal des médiateurs de l'inflammation notamment de NFkB (Deruddre, Combettes et al. 2010). Cette diminution du transport axonal se traduit cliniquement par une réduction de l'hyperalgésie et de l'inflammation locale suite à un bloc nerveux prolongé qui dépasse 5 heures (Gentili, Mazoit et al. 1999).

6.6. Action directe sur les neurones de la corne postérieure de la moelle épinière

Les AL diminuent l'activation des neurones de la corne postérieure de la moelle épinière suite à une stimulation abdominale nociceptive (Ness 2000). Cette diminution de la stimulation neuronale joue un rôle important dans la stimulation et la sensibilisation du SNC et donc dans sa réponse à cette nociception.

6.7. Action sur la microglie

Un prétraitement de la microglie isolée par la lidocaïne diminue d'une façon dose dépendante la stimulation inflammatoire de ces cellules par du LPS. En effet, on note une diminution du TNF, de l'IL-1 β , du NFkB, du NO et de PGE2 (Yuan, Li et al. 2014).

6.8. Action sur les astrocytes

Les AL diminuent la stimulation astrocytaire après cotraitement par de faibles concentrations de bupivacaïne et de LPS (Block, Jorneberg et al. 2013).

Ces deux dernières actions sur la microglie et les astrocytes sont importantes dans la compréhension de la chronicisation de la douleur et probablement de la durée du phénomène douloureux.

L'ensemble des actions des AL sur les cellules du SNC et sur l'inflammation centrale explique en partie la limitation du « réflexe d'axone » et du « réflexe médullaire ». En effet, la réponse inflammatoire neurogénique locale suite à une stimulation nociceptive est considérée comme secondaire à l'activation des terminaisons afférentes primaires par l'intermédiaire du « réflexe d'axone ». Elle peut également être initiée au niveau spinal par une dépolarisation des afférences primaires suffisamment importante pour activer le « réflexe médullaire » passant par la racine postérieure. Ces 2 réflexes joueraient un rôle dans l'inflammation neurogénique. Les AL sont connus pour avoir un effet atténuant sur ces 2 phénomènes (Fletcher, Kayser et al. 1996; Duarte, Pospisilova et al. 2005) mais les mécanismes d'action de cet effet ne sont pas élucidés à ce jour.

En résumé, les AL présentent des effets directs sur les muscles intestinaux, sur le système inflammatoire et sur le SNC. L'ensemble de ces actions explique leur efficacité dans la douleur viscérale.

II- OBJECTIFS DE NOS TRAVAUX

Il est actuellement admis que l'inflammation constitue la composante principale dans la douleur post opératoire. Cette inflammation active et sensibilise le SNC qui, à son tour, influe sur l'installation de l'inflammation périphérique. La transmission de l'inflammation vers le SNC se fait à travers les racines nerveuses qui acheminent les cytokines et par voie systémique.

La modulation de la réponse inflammatoire préviendrait les lésions tissulaires et la chronicisation de la douleur. Nos travaux se sont intéressés à l'étude de l'effet des AL sur l'inflammation.

Dans un modèle d'inflammation périphérique induite par l'injection de carragénine dans la patte de l'animal, il a déjà été démontré que les AL par bloc nerveux périphérique entraînaient une réduction de l'hyperalgésie et de l'inflammation locale et systémique (Gentili, Mazoit et al. 1999; Beloeil, Ababneh et al. 2006). Cette réduction de l'inflammation est observée quand le bloc nerveux est réalisé du côté ipsi ou controlatéral à la patte stimulée. Cependant, l'injection par voie systémique d'AL ne réduit pas l'inflammation locale périphérique. Il existe des arguments forts qui sont en faveur d'un mécanisme d'action local ou loco régional dans ce type d'inflammation.

Lors d'une laparotomie, une inflammation systémique s'installe et est associée à la douleur post opératoire. En effet, cette inflammation est due à une double réponse inflammatoire ; (1) la première est la réponse de la paroi abdominale (pariétale) suite à l'agression des muscles et du tissu mou et (2) la deuxième est la réponse inflammatoire de la cavité abdominale (viscéro péritonéale) suite à l'agression des viscères et du péritoine.

Lors d'une chirurgie abdominale, la transmission des médiateurs de l'inflammation vers le SNC implique plusieurs structures nerveuses : (1) les nerfs spinaux (à travers la moelle épinière), (2) le nerf vague et (3) le SNS.

Dans le cadre de la chirurgie abdominale, l'administration d'AL par l'intermédiaire d'un cathéter placé en position pré péritonéale ou par un bloc du muscle transverse abdominal (TAP) permet une réduction de la consommation de

morphine, une analgésie satisfaisante et une réhabilitation post opératoire plus rapide (Beaussier, El'Ayoubi et al. 2007).

L'administration de lidocaïne par voie systémique lors d'une laparotomie est également associée à un effet antalgique et à une diminution de la réaction inflammatoire systémique et à une réhabilitation post opératoire plus rapide (Herroeder, Pecher et al. 2007; Kaba, Laurent et al. 2007).

L'effet bénéfique des AL est dû aux différents mécanismes d'action largement décrits plus haut.

1- Notre hypothèse de travail est de rechercher et de démontrer un effet systémique des AL dans la chirurgie abdominale. Nos travaux ont ainsi porté sur la comparaison de deux techniques d'ALR utilisées en pratique clinique (TAP et cathéter d'infiltration) à une administration systémique des AL dans deux modèles d'inflammation péritonéale par chirurgie ou par injection de carragénine chez le rat.

2- De plus, nous nous sommes intéressés à étudier le rôle des deux composantes pariétale et viscérale de la douleur abdominale dans la transmission de la nociception vers le SNC.

Le but de nos travaux est de vérifier l'effet anti inflammatoire des AL chez l'animal, de comparer les modalités d'administration des AL et de préciser le rôle respectif du nerf vague et de la corne postérieure de la moelle épinière dans la transmission de la nociception abdominale.

1- Ainsi, nous avons commencé par comparer l'effet des AL administrés par voie systémique ou par cathéter pré péritonéal dans un modèle de péritonite chirurgicale.

2- Par la suite, nous avons procédé à la validation d'un bloc de la paroi abdominale chez le rat.

3- Puis nous avons utilisé un modèle d'inflammation chimique à la carragénine chez le rat chez qui nous avons provoqué séparément une réaction inflammatoire de la paroi ou une réaction inflammatoire de la cavité abdominale ce qui nous a permis d'étudier le rôle d'un bloc de la paroi abdominale dans la transmission de la nociception pariétale et viscérale vers le SNC.

4- Devant l'importance du nerf vague dans la transmission de la nociception vers le SNC sans passage préalable par la moelle épinière et afin d'éliminer un rôle médullaire locorégional de l'effet des AL dans la transmission de la nociception vers le système nerveux supramédullaire, nous avons comparé l'effet des AL par voie systémique à celui d'une vagotomie unilatérale préventive.

Au cours de nos travaux, nous avons procédé à une étude comportementale, au dosage des cytokines (IL-1 β et TNF- α) dans la circulation sanguine et dans le péritoine dans un modèle de péritonite chirurgicale chez le rat. De plus, nous avons étudié l'expression de c-Fos et de TNF- α au niveau du tractus du noyau solitaire et de la moelle épinière dans un modèle de péritonite inflammatoire induite par la carragénine chez le rat.

III- MATERIEL ET METHODES

1. Animaux

L'étude a été réalisée en utilisant des rats *Sprague-Dawley* dont le poids était compris entre 175 et 225g (Elevage Janvier, Le Genest-St-Isle, France). Tous les rats utilisés pendant ces expérimentations ont été hébergés dans les locaux de l'animalerie de la Faculté de Médecine Paris Sud XI, maintenus à une température de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ et un cycle jour/nuit de douze heures, par groupes de deux à trois rats par cage. Ils avaient un accès libre à l'eau et à l'alimentation. Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique CEEA26 (2012_089).

2. Solutions utilisées

2.1. Molécules thérapeutiques étudiées

Les AL utilisés ont été la bupivacaïne et la ropivacaïne.

La ropivacaïne (Naropeïne®, AstraZeneca, Rueil Malmaison, France) à la concentration finale de 2 mg/ml et 7,5 mg/ml a été utilisée au cours de l'étude 1.

La bupivacaïne à 0,25% adrénalinée à 1:200000 (Mylan, Saint Priest, France) a été utilisée au cours de l'étude 2.

La bupivacaïne est un mono amide dont le poids moléculaire est de 288 daltons et le pKa de 8,1. Elle se lie à 95% aux protéines plasmatiques. La durée d'action d'un bloc nerveux périphérique est de 3 à 4 heures chez l'homme, moins d'une heure chez le rongeur. La solution de microsphères de bupivacaïne utilisée dans l'étude 3 est constituée de 37,5 mg de chlorhydrate de bupivacaïne, 49,9 mg de RG503H (D,L-Polylactide-co-glycolide polymère 50:50), 125 mg de mannitol et 1,25 mg de Tween 20 à diluer dans l'eau pour obtenir la concentration voulue. Le véhicule est composé de 49,9 mg de RG503H, de 125 mg de mannitol et d'1,25 mg de Tween 20.

2.2. Carragénine λ

La carragénine λ (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) utilisée est fraîchement préparée et diluée dans du sérum physiologique pour obtenir une solution à 3% juste avant utilisation.

3. Cathéters pré péritonéaux

Les cathéters utilisés pour la perfusion des AL sont des cathéters périduraux modifiés. Ils sont perforés sur une longueur de cinq centimètres tous les 5 mm.

4. Modèles et techniques utilisés

4.1. Modèle chirurgical (étude 1)

Le modèle chirurgical utilisé est celui décrit par Roughan et al. (Roughan and Flecknell 2001). Les rats sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale de 50 mg/Kg de pentobarbital sodique (Centravet), ils reçoivent une injection intramusculaire de 15 mg d'amoxicilline puis subissent une laparotomie médiane de quatre à cinq centimètres de longueur et leurs viscères sont manipulés délicatement pendant deux minutes. La paroi abdominale est ensuite refermée en trois plans : (1) un premier plan profond constituant le péritoine, (2) un deuxième plan intermédiaire englobant les muscles grands droits de la paroi abdominale et leurs fascias et (3) un troisième plan superficiel cutané. Les trois plans sont refermés en surjet en utilisant des fils résorbables pour le plan profond et intermédiaire et des fils non résorbables pour la peau.

Des cathéters sont posés entre le péritoine et le plan profond. Une tunnelisation sous-cutanée des cathéters est réalisée entre le site chirurgical et la région interscapulaire dans le but d'éviter leur arrachement par l'animal.

Après la chirurgie, les rats sont séparés dans des cages individuelles jusqu'à la fin de l'expérimentation.

4.2. Bloc de la paroi abdominale (études 2 et 3)

Le bloc de la paroi abdominale a été validé dans l'étude 2 et utilisé dans l'étude 3.

Ce bloc était réalisé sous anesthésie générale au pentobarbital. Après rasage du dos, le rat est mis en décubitus ventral, l'épineuse de T13 est d'abord identifiée puis celles de T5, T10, L1, L4 et S1. Le bloc est réalisé avec une aiguille de 23G. Les points d'injection se situent à 3 mm des épineuses de T5, T10, L1, L4 et S1. L'injection était faite après le franchissement de la première couche musculaire.

Dans la première partie de l'étude 2 (l'étude anatomique), une solution diluée d'Indigo Carmin (Laboratoires SERB, Paris, France) était utilisée pour visualiser la diffusion du produit après dissection du rat.

Dans la deuxième partie de l'étude 2, la bupivacaïne à 0,25% adrénalinée ou le sérum physiologique ont été utilisés pour permettre une évaluation comportementale et immunohistochimique de la nociception.

Pour l'étude 3, des microsphères de bupivacaïne ou de véhicule ont été injectées en fonction du groupe expérimental. La dose totale injectée de bupivacaïne était de 15 mg/kg.

4.3. Inflammation à la carragénine (études 2 et 3)

La carragénine, de « *carragin* », « mousse » en Irlandais, est une variété d'algues rouges *Chondrus crispus* présente sur la côte Atlantique des îles Britanniques, de l'Europe et de l'Amérique du Nord. En 1862, Stanford, Pharmacien Britannique, en extrait un mucopolysaccharide. Les carragénines sont un groupe complexe de polysaccharides constitués de monomères de galactose. Les différents types de carragénine (lambda, kappa et iota) se distinguent par des propriétés gélatineuses spécifiques, toutes variables en fonction de la température. La forme lambda, peu visqueuse à température ambiante, injectée chez l'animal est un modèle classique d'inflammation (Morris 2003). Initialement décrite par Winter et al. en 1962 (Winter,

Risley et al. 1962), cette inflammation induite par la carragénine est aiguë, non immune, bien documentée et reproductible. Immédiatement après l'injection sous cutanée, la triade clinique caractéristique de l'inflammation (œdème, hyperalgésie et érythème) apparaît. La réponse inflammatoire est généralement mesurée par l'augmentation du volume de la patte de l'animal due à l'œdème. Le modèle d'inflammation induite par la carragénine a été un outil indispensable au développement des anti inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (Vane and Botting 1995). En effet, l'inhibition de l'inflammation induite par la carragénine est prédictive de l'activité anti inflammatoire de la molécule pharmacologique testée.

Le modèle d'inflammation induite par la carragénine est largement utilisé dans la littérature comme modèle pour étudier l'inflammation périphérique. Plusieurs études expérimentales montrent que, dans ce modèle d'inflammation périphérique, les AL possèdent un effet anti inflammatoire (Gentili, Mazoit et al. 1999; Estebe, Gentili et al. 2004; Beloeil, Ababneh et al. 2006). Cependant, d'autres études expérimentales montrent que la carragénine induit également une inflammation pleurale (Cailhier, Sawatzky et al. 2006) ou péritonéale (Damas, Bourdon et al. 1990; Pagano, Dias et al. 2002; da Matta, de Souza et al. 2011). L'inflammation péritonéale provoquée par la carragénine survient surtout 2 heures après la stimulation et induit une sécrétion exsudative (Damas, Bourdon et al. 1990).

L'avantage de ce modèle de péritonite utilisé dans nos travaux est la réversion des lésions provoquées et la possibilité de surveiller les animaux à distance de la stimulation par rapport à d'autres stimulations comme l'acide acétique ou l'acide chlorhydrique qui laissent des séquelles irrécupérables. Un autre avantage est la ressemblance de ce modèle à une péritonite inflammatoire post opératoire en comparaison avec la péritonite infectieuse provoquée par le LPS. Ainsi la péritonite induite par la carragénine est une péritonite légère avec une composante inflammatoire importante. Elle correspond plus à une coelioscopie chirurgicale ou à une mini laparotomie qu'à une péritonite infectieuse grave comme une péritonite appendiculaire ou une péritonite par ouverture de la paroi du tube digestif.

Au cours de nos travaux, nous avons utilisé la carragénine pour provoquer l'inflammation pariétale et péritonéale :

(1) dans le but de provoquer l'inflammation pariétale de l'étude 2, 0,5 ml de carragénine à 2,5% a été utilisée.

(2) Pour l'étude 3, 1 ml de carragénine à 3% a été injecté dans la paroi abdominale ou en intrapéritonéal selon le groupe expérimental.

Les points d'injection de la carragénine dans les 2 études (2 et 3) sont les mêmes, de part et d'autre de la ligne blanche (Figure 14).

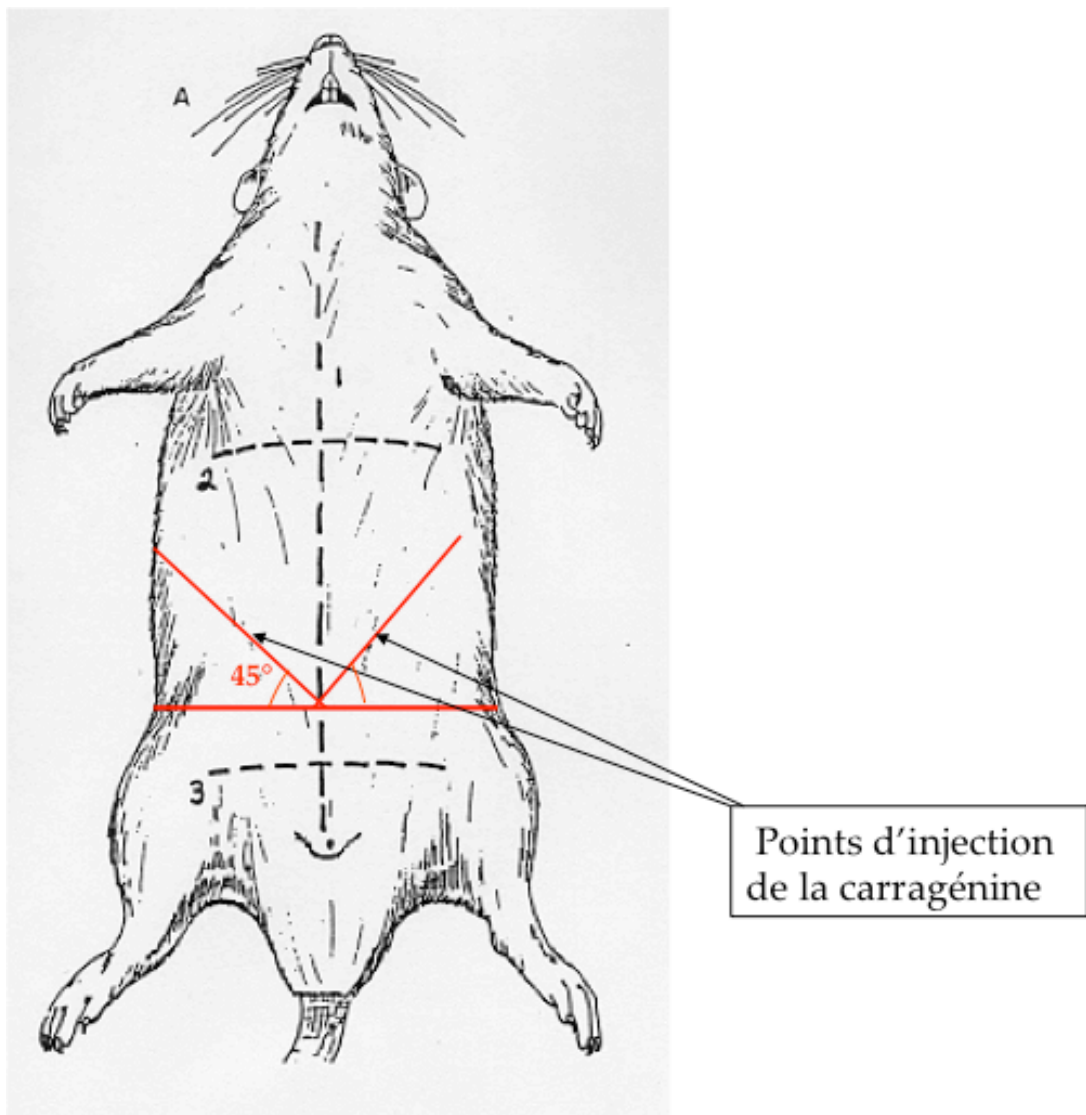


Figure 14- Points d'injection de la carragénine (pariétaux et péritonéaux) dans les études 2 et 3

4.4. Vagotomie (étude 3)

La vagotomie est réalisée sous anesthésie générale inhalatoire à l'isoflurane. Cette vagotomie droite est chimique et induite par une injection supra claviculaire de 30 μ L d'éthanol absolu mélangé au bleu de trypan (Figures 15 et 16). Pour tous les rats ayant subi une vagotomie, deux dissections cervicale droite et gastrique ont été réalisées systématiquement après l'euthanasie pour vérifier la diffusion péri nerveuse (nerf vague droit) de l'éthanol et la distension gastrique.

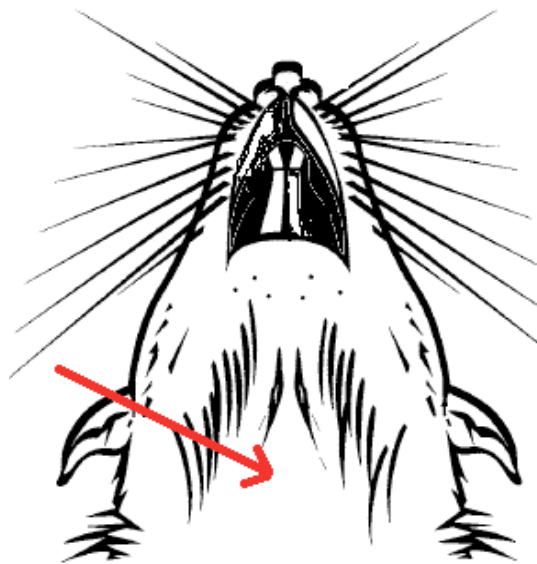


Figure 15- Zone d'injection au niveau cervical

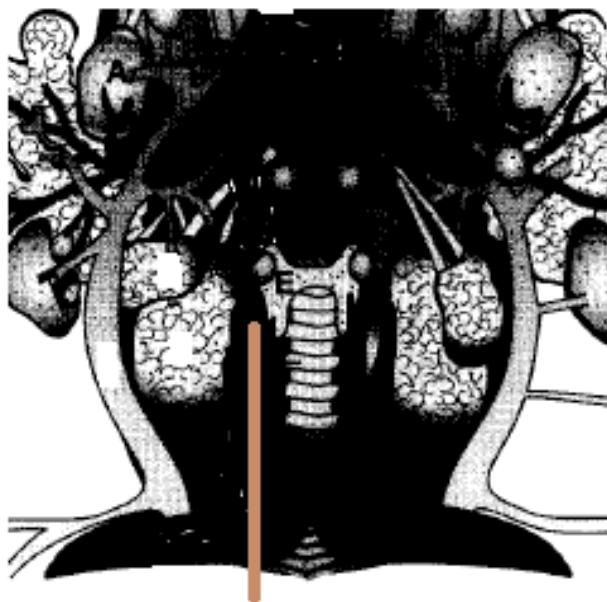


Figure 16- Trajet du nerf vague

4.5. Prélèvements sanguins (étude 1)

Des prélèvements sanguins par ponction intracardiaque ont été effectués après la chirurgie dans le but (1) de doser des cytokines sanguines inflammatoires (TNF- α et IL1- β) et (2) de doser la concentration plasmatique de ropivacaïne.

Seuls les prélèvements destinés au dosage de la concentration plasmatique de ropivacaïne après la première injection intramusculaire, dans le groupe Ropi IM, ont été effectués vingt minutes après la première injection intramusculaire. Tous les autres prélèvements sanguins ont été effectués à 4, 24 et 48 heures après la chirurgie.

Les rats ont été anesthésiés par isoflurane (Aerrane®, Baxter) pour les prélèvements du jour de l'intervention chirurgicale et par une injection intrapéritonéale de 50 mg/kg de pentobarbital sodique pour les jours suivants. Les prélèvements sont réalisés par ponction rétro orbitaire ou intracardiaque.

Tous les prélèvements sanguins ont été compensés par une injection sous-cutanée de trois volumes de sérum physiologique pour un volume de sang prélevé.

Le sang destiné au dosage de la ropivacaïne a été centrifugé à 3000 tours par minute. Le plasma a été ensuite récupéré et congelé à -20°C. Le dosage médicamenteux a été fait par chromatographie en phase gazeuse.

Le sang destiné aux dosages du TNF- α et de l'IL1- β sanguins a été dilué au cinquième dans du RPMI. Deux échantillons de 500 μ l de sang dilué ont été incubés dans une plaque de 24 puits à 37°C et 5% de CO₂ pendant 24 heures : (1) un échantillon a été préalablement stimulé par 5 μ l de LPS d'*Escherichia coli* (Sigma) à 1 mg/ml et (2) un échantillon a servi de contrôle sans aucune stimulation préalable. Le lendemain, les échantillons ont été centrifugés à 3000 tours par minute, le plasma a été ensuite récupéré et conservé à -80°C.

4.6. Lavage péritonéal (étude 1)

Un lavage péritonéal ainsi qu'une culture des macrophages récupérés à l'issue du lavage ont été réalisés afin d'évaluer l'inflammation péritonéale.

Le lavage péritonéal a été réalisé systématiquement chez des rats préalablement anesthésiés lors de la chirurgie, puis à 24 et 48 heures en post chirurgie.

Le péritoine a été lavé avec 10 ml de PBS. Le liquide récupéré est centrifugé à 750 tours par minute. Le culot cellulaire obtenu a été récupéré dans 2 ml de RPMI et incubé pendant trois heures à 37°C et 5% de CO₂ dans des plaques de culture cellulaires à 6 puits. Après lavage des plaques avec du PBS, les macrophages adhérents ont été récupérés par un grattage doux à l'aide de *cell scraper* 16 cm (Sarstedt). Après comptage sur cellule de Malassez, les macrophages ont été dilués à une concentration de un million de cellules/ml de RPMI. 500 µl de la solution macrophagique ont été stimulés par 5 µl de LPS à la concentration de 1 mg/ml et incubés pendant 24 heures dans les mêmes conditions de culture cellulaire. Le surnageant a été récupéré et congelé à -80°C. Le dosage du TNF-α et de l'IL1-β a été réalisé en double exemplaire pour chaque condition expérimentale par ELISA (kit DuoSet® R&D system).

4.7. Chromatographie en phase gazeuse (étude 1)

Cette technique a été utilisée dans l'étude 1 pour le dosage de la concentration plasmatique de la ropivacaïne.

Les principales étapes de la chromatographie en phase gazeuse ont été les suivantes :

(1) étape d'extraction de la ropivacaïne : pour cela un échantillon de 500 µl de plasma a été mélangé à 100 µl de standard (mépivacaïne 10 µg/ml), 100 µl d'une solution de NaOH (4M) et 200 µl de pentane. Le mélange a été vortexé puis centrifugé pendant 2 minutes à 14000 tours par minute. Une gamme de concentrations connues pour la mépivacaïne a été également réalisée.

(2) Deux µl du surnageant ont été injectés dans le chromatographe.

(3) L'aire sous la courbe de la ropivacaïne a été rapportée à celle du standard interne.

Le seuil de détection de cette technique est de 0,02 µg/ml.

4.8. ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Les concentrations de TNF- α et d'IL1- β dans le surnageant ont été mesurées en double à l'aide d'un kit ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) selon les recommandations du fournisseur (DuoSet®; *R&D systems*). Il s'agit d'une technique dite d'immunodétection en « *sandwich* », avec des anticorps monoclonaux anti-rats dirigés contre la cytokine dosée

Le seuil de détection de ces kits est de 30 pg/ml pour la cytokine étudiée.

4.9. Fixation et prélèvements des tissus (études 2 et 3)

Les prélèvements tissulaires ont été fixés et prélevés à 2 heures (H2) ou à 48 heures (H48) après l'inflammation en fonction de l'étude immunohistochimique prévue pour chaque groupe.

Les prélèvements à H2 ont été destinés à la révélation immunohistochimique de c-Fos, ceux réalisés à H48 ont été destinés à l'étude du TNF- α .

La fixation tissulaire a été réalisée sous anesthésie générale par injection intrapéritonéale de pentobarbital à 50 mg/kg. Les tissus ont été fixés par une perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde à 4% (Roth labo).

La moelle épinière prélevée a été coupée en plusieurs blocs de deux métamères chacun.

L'encéphale et la moelle épinière ont été inclus dans la paraffine, puis coupés à une épaisseur de 0,8 mm et montés sur des lames « *super frost plus* » (Roth laboratoires, Lautebourg, France).

4.10. Etude immunohistochimique (études 2 et 3)

Après déparaffinage, réhydratation, blocage des peroxydases internes et des sites non spécifiques, les lames ont été incubées pendant la nuit à +4°C dans une solution d'anticorps primaire de lapin biotinylé dilué au 1:500 pour c-Fos (Merk Millipore, Fontenoy sous-bois, France) et 1:300 pour TNF- α (Abcam).

Le lendemain les lames ont été incubées dans une solution d'anticorps secondaire de chèvre anti lapin dilué au 1:1000 (Merk Millipore) pendant 1 heure.

Après rinçage, les lames ont été incubées dans le complexe d'amplification Avidine-Biotine (AB Complex ; PK-6100, Vector Laboratories) pendant 1 heure, puis la révélation a été faite par oxydation de Di-Amino-Benzidine (DAB 0,035% : SK4600 ; Vector laboratories).

Les lames ont été observées au microscope optique et les noyaux ont été comptés au grossissement X10 et X40 par un investigateur indépendant.

4.11. Etude comportementale (étude 1)

4.11.1. Evaluation de la douleur viscérale

Le stimulus viscéral s'est fait par distension colorectale réalisée à l'aide d'un ballonnet en latex de 4 cm de diamètre inséré dans le colon par voie rectale (Peles, Miranda et al. 2004; Yang, Yao et al. 2006). Le ballonnet a été gonflé avec de l'air dans le colon du rat. L'augmentation de la pression intracolique a entraîné une contracture des muscles abdominaux. En fonction des muscles mis en jeu, Al Chaer et al. ont décrit le score AWR (*Abdominal Withdrawal Reflex*) qui permet l'évaluation de la réponse à la distension colorectale (Al-Chaer, Kawasaki et al. 2000; Al-Chaer, Kawasaki et al. 2000) (Figure 17). Ce score initialement utilisé dans l'évaluation de la douleur chronique, a été secondairement validé dans l'évaluation de la douleur viscérale aiguë (Yang, Yao et al. 2006).

La pression générée à l'intérieur du ballonnet a été mesurée à l'aide d'un manomètre constitué par une colonne en verre graduée en forme de « U » contenant du mercure.

L'évaluation de la douleur viscérale a été réalisée à trois reprises :

(1) le jour de l'intervention chirurgicale (J0) après le réveil des rats (4 heures après la chirurgie). La pression intracolique retenue comme positive a été celle correspondante à un score AWR de 2.

(2) 24 heures après la fin de l'intervention chirurgicale (à J1), juste après l'arrêt de la perfusion de l'AL dans le cathéter pré péritonéal. La pression intracolique retenue comme positive a été celle correspondante à un score AWR de 3.

(3) 48 heures après la fin de l'intervention chirurgicale (à J2). La pression intracolique retenue comme positive a été celle correspondante à un score AWR de 3.

Lors de chacune de ces évaluations, trois mesures consécutives ont été réalisées et la moyenne des trois valeurs obtenues a été retenue. La pression limite de la distension colorectale est fixée à 80 mmHg afin d'éviter la survenue de perforation colique. Aucune mesure de pression intracolique sur des rats non opérés n'a été faite.

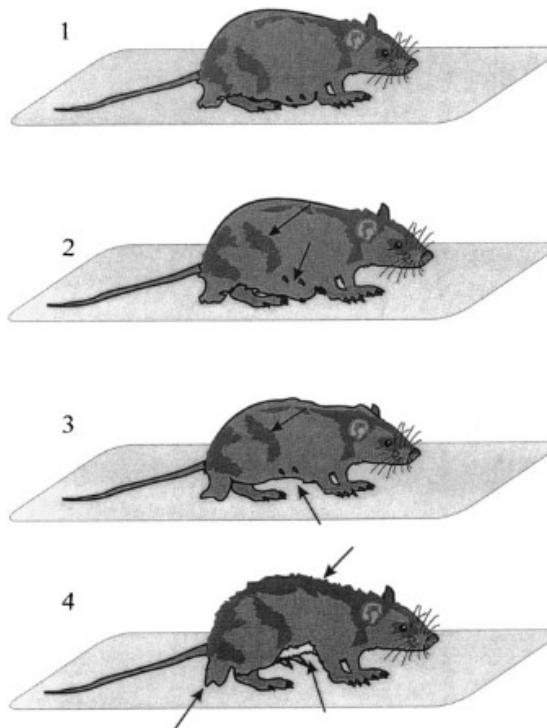


Figure 17- Les flèches montrent les différents groupes musculaires contractés selon le niveau du score AWR. Le score (1) correspond à l'absence de contraction musculaire, le rat est figé. Le score (2) correspond à une contracture minime des muscles abdominaux. Le score (3) correspond à une contraction des muscles grands droits de l'abdomen avec une surélévation de l'abdomen par rapport au support de l'animal. Le score (4) correspond à un arrondissement du dos et à une surélévation pelvienne par rapport au support de l'animal

4.11.2. Evaluation de la douleur pariétale

L'intensité de la douleur pariétale est évaluée par la mesure de la réponse à un stimulus mécanique (pression) en utilisant des filaments de von Frey. Les filaments sont appliqués en commençant par le diamètre le plus faible (filament numéro 3) et en finissant par le diamètre le plus gros (filament numéro 19). Chaque filament est appliqué sur trois points différents de la plaie abdominale. L'application des filaments est réalisée en allant du point le plus éloigné de la plaie chirurgicale et en se rapprochant progressivement par des paliers d'un demi centimètre. La réponse est

considérée positive lorsque le rat réagit sur deux points distincts. Trois mesures sont réalisées sur chaque point et la valeur moyenne des trois mesures est retenue

L'évaluation de la douleur pariétale est réalisée en concomitance avec l'évaluation de la douleur viscérale : (1) à J0 après le réveil du rat, (2) à 24 heures de l'intervention chirurgicale juste après l'arrêt de la perfusion continue d'AL dans le cathéter pré péritonéal et (3) à 48 heures de la chirurgie.

4.11.3. Score clinique global

Un score clinique en quatre points est appliqué dans le but d'évaluer le comportement global des rats après une intervention chirurgicale.

Ce score évalue (1) l'activité du rat dans sa cage, (2) l'aspect des poils (lisses ou hérissés, blancs ou pâles) et (3) la possibilité de se tenir sur les 2 pattes arrière ce qui est considéré dans la littérature comme étant le facteur prédictif le plus important de la récupération après une agression abdominale.

Ce score est défini comme suit :

(1) : le rat ne bouge que pour manger et présente des poils très hérissés et/ou pâles.

(2) : Le rat bouge dans sa cage en surélevant l'abdomen et présente des poils toujours hérissés et/ou pâles.

(3) : Le rat déambule normalement dans sa cage sans se dresser à 2 pattes arrière et présente des poils plutôt lisses et blancs.

(4) : Le rat se comporte normalement et se dresse sur ses 2 pattes arrière.

Le score clinique global est appliqué trois fois lors de ce travail juste avant l'évaluation des douleurs viscérale et pariétale : (1) à J0 après le réveil du rat, (2) à 24 heures de l'intervention chirurgicale juste après l'arrêt de la perfusion continue de

l'AL dans le cathéter pré péritonéal et (3) à 48 heures de la chirurgie. Le rat est observé dans sa cage ouverte pendant 3 minutes sans stimulation et le meilleur score observé est retenu.

5. Statistiques

Les données ont été analysées selon les principes suivants :

1- La distribution des données a d'abord été étudiée graphiquement, puis le caractère Gaussien a été vérifié (ou non) par quantile quantile (qq)-plot et test de Shapiro.

2- Les données dichotomiques ont été comparées par le test de Chi².

3- Selon le type de distribution, les données continues ont été étudiées soit par des méthodes statistiques paramétriques (ANOVA factorielle ou avec mesures répétées, test t de Student corrigé pour comparaisons multiples) ou par des méthodes statistiques non paramétriques (ANOVA non paramétrique suivie d'un des tests de Wilcoxon corrigé par l'inégalité de Bonferroni si nécessaire).

Les données dichotomiques sont exprimées en fraction (ou pourcentage). Les données continues sont exprimées en moyenne et écart-type ou médiane et intervalle interquartile et/ou extrêmes.

IV-DEROULEMENT DES EXPERIENCES ET RESULTATS

1. Déroulement de l'étude 1

Après chirurgie (laparotomie ou sham), les rats ont été randomisés en 9 groupes en fonction de mode d'administration et de la concentration de la ropivacaïne.

Une fois que les cathéters pré péritonéaux ont été mis en place, un bolus de 0,1 ml de ropivacaïne 2 mg/ml (pour le groupe ropi 2), de ropivacaïne 7,5 mg/ml (pour le groupe ropi 7,5) ou de sérum physiologique (pour le groupe IM) a été administré à travers les cathéters. Une injection IM de 0,1 ml de sérum physiologique (pour les groupes ropi 2 et ropi 7,5) ou de ropivacaïne 7,5 mg/ml (pour le groupe IM) a été également administrée.

Ces injections ont été suivies par l'administration d'une injection continue de 0,1 ml/h de ropivacaïne ou de sérum physiologique selon les groupes expérimentaux pendant 24 heures (Figure 18 et tableau 4).

Tableau 4- Groupes expérimentaux de l'étude 1. Phy : physiologique ; IM : intramusculaire

Groupes	Bolus pré péritonéal (0,1 ml)	Infusion pré péritonéale continue	Injection Systémique
Sham			
Non opérés	-	-	-
Sham sérum phy	Sérum phy	Sérum phy	Sérum phy
Sham ropi 2	Ropivacaïne 2 mg/ml	Ropivacaïne 2 mg/ml (Dose totale = 5 mg)	Sérum phy
Sham ropi 7,5	Ropivacaïne 7,5 mg/ml	Ropivacaïne 7,5 mg/ml (Dose totale = 18,75 mg)	Sérum phy
Sham ropi IM	Sérum phy	Sérum phy	Ropivacaïne 7,5 mg/ml (Dose totale = 2,25 mg)
Laparotomie			
Sérum phy	Sérum phy	Sérum phy	Sérum phy
Ropi 2	Ropivacaïne 2 mg/ml	Ropivacaïne 2 mg/ml (Dose totale = 5 mg)	Sérum phy
Ropi 7,5	Ropivacaïne 7,5 mg/ml	Ropivacaïne 7,5 mg/ml (Dose totale = 18,75 mg)	Sérum phy
Ropi IM	Sérum phy	Sérum phy	

Les expériences de l'étude 1 se sont déroulées selon le schéma suivant (Figure 18) :

- chirurgie sous anesthésie générale et pose des cathéters pré péritonéaux.
- Injections IM toutes les 8 heures pendant les premières 24 heures après la chirurgie.
- Injection d'un bolus dans les cathéters pré péritonéaux juste à la pose puis perfusion continue pendant 24 heures.
- Prélèvements sanguins à 5 et 20 minutes, puis à 24 et 48 heures après la chirurgie.
- Lavage péritonéal pendant la chirurgie, puis à 24 et 48 heures après la chirurgie. Ce lavage a été réalisé dans le but de recueillir un nombre maximal de cellules inflammatoires.
- Etude comportementale à 6, 24 et 48 heures de la chirurgie.

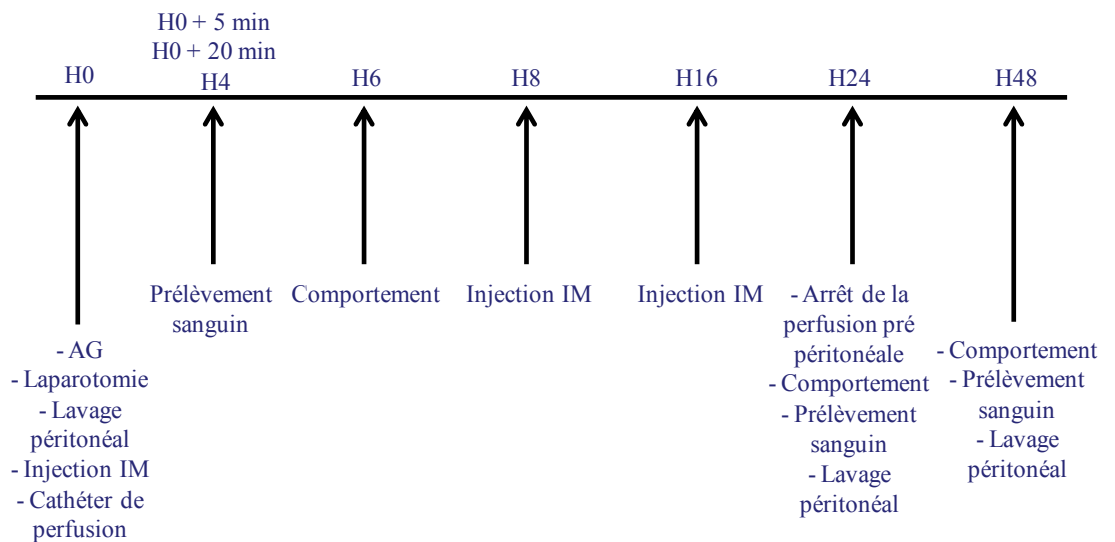


Figure 18- Déroulement des expériences de l'étude 1. AG : Anesthésie Générale ; IM : intramusculaire

2. Résultats de l'étude 1

2.1. Tests comportementaux

2.1.1. Evaluation de la douleur viscérale par distension colorectale (n = 11 à 12) (Figure 19)

a- Groupes sham

Dans le groupe non opéré, tous les animaux sauf un tolèrent une pression colorectale de 80 mmHg qui correspond à la pression limite exercée.

Ces résultats sont significativement différents de ceux observés dans les autres groupes sham opérés à J0. Ces derniers ne sont pas différents entre eux dans le temps.

Seul le groupe Ropi IM présente une récupération complète dès J1.

b- Groupes laparotomie

Dans le groupe sérum phy, la pression colorectale tolérée est significativement plus élevée à J1 et à J2 en comparaison avec J0 (4 heures après la chirurgie).

A J0, soit 6 heures après la chirurgie, les niveaux de la pression colorectale exercée sont plus élevés dans les groupe Ropi 7,5 et Ropi IM en comparaison avec les groupes sérum phy et Ropi 2.

Aucune différence significative n'est observée entre les groupes sérum phy et Ropi 2 ni entre les groupes Ropi 7,5 et Ropi IM.

A J1, les groupes Ropi 7,5 et Ropi IM sont différents du groupe sérum phy.

A J2, aucune différence significative entre les groupes n'est observée car les rats des différents groupes tolèrent des pressions avoisinantes de la pression limite (80 mmHg) (Figure 19).

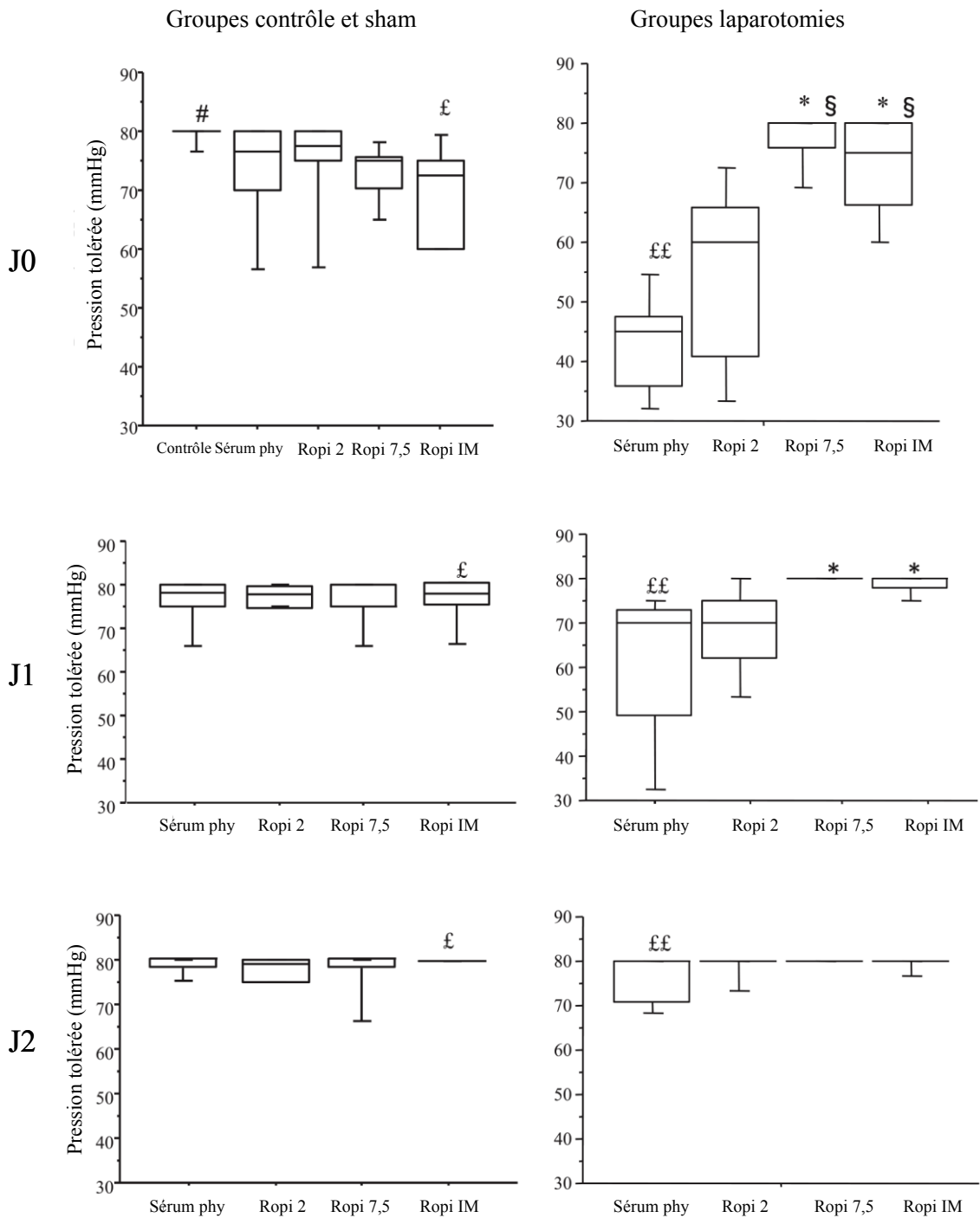


Figure 19- Pression colorectale (en mmHg) générant une douleur viscérale détectée selon le score AWR. Dans les groupes : contrôle, sham opérés et laparotomie à J0 (a et b), J1 (c et d) et J2 (e et f). Les résultats sont représentés dans des boîtes à moustaches où sont représentés les 10^{ième}, 25^{ième}, 50^{ième}, 75^{ième} et 90^{ième} percentiles. Les points représentent les valeurs extrêmes

$p < 0,05$ vs les 4 groupes sham opérés

£ $p < 0,05$ et ££ $p < 0,01$ à travers le temps (J0 vs J1 vs J2)

* $p < 0,05$ vs groupe laparotomie sérum phy

§ $p < 0,05$ vs groupe laparotomie Ropi 2

2.1.2. Evaluation de la douleur pariétale par application des filaments de von Frey (n = 10 à 11) (Figure 20)

a- Groupes sham opérés

Dans le groupe contrôle, tous les animaux tolèrent la pression pariétale maximale appliquée par les filaments de von Frey (137,3 g/mm²).

La différence entre le groupe contrôle et les 4 autres groupes sham n'est pas significative à J0.

A J1 et à J2 la différence n'est pas non plus significative entre les 4 groupes sham opérés.

Seul le groupe sham Ropi 7,5 récupère d'une façon significative entre J0 et J2.

b- Groupes laparotomie

L'évolution de la sensibilité pariétale est identique à celle de la sensibilité viscérale pour le groupe sérum phy. En effet, les pressions tolérées à J1 et à J2 sont significativement supérieures à celles tolérées à J0.

A J0, les pressions tolérées par les groupes Ropi 7,5 et Ropi IM sont significativement supérieures à celles tolérées par les groupes Ropi 2 et sérum phy. Aucune différence significative n'est observée entre les groupes sérum phy et Ropi 2 ou entre les groupes Ropi 7,5 et Ropi IM.

A J1 et J2, les groupes traités tolèrent des pressions pariétales supérieures à celles tolérées par le groupe sérum phy. Aucune différence significative n'est observée entre les groupes traités à J1 et J2.

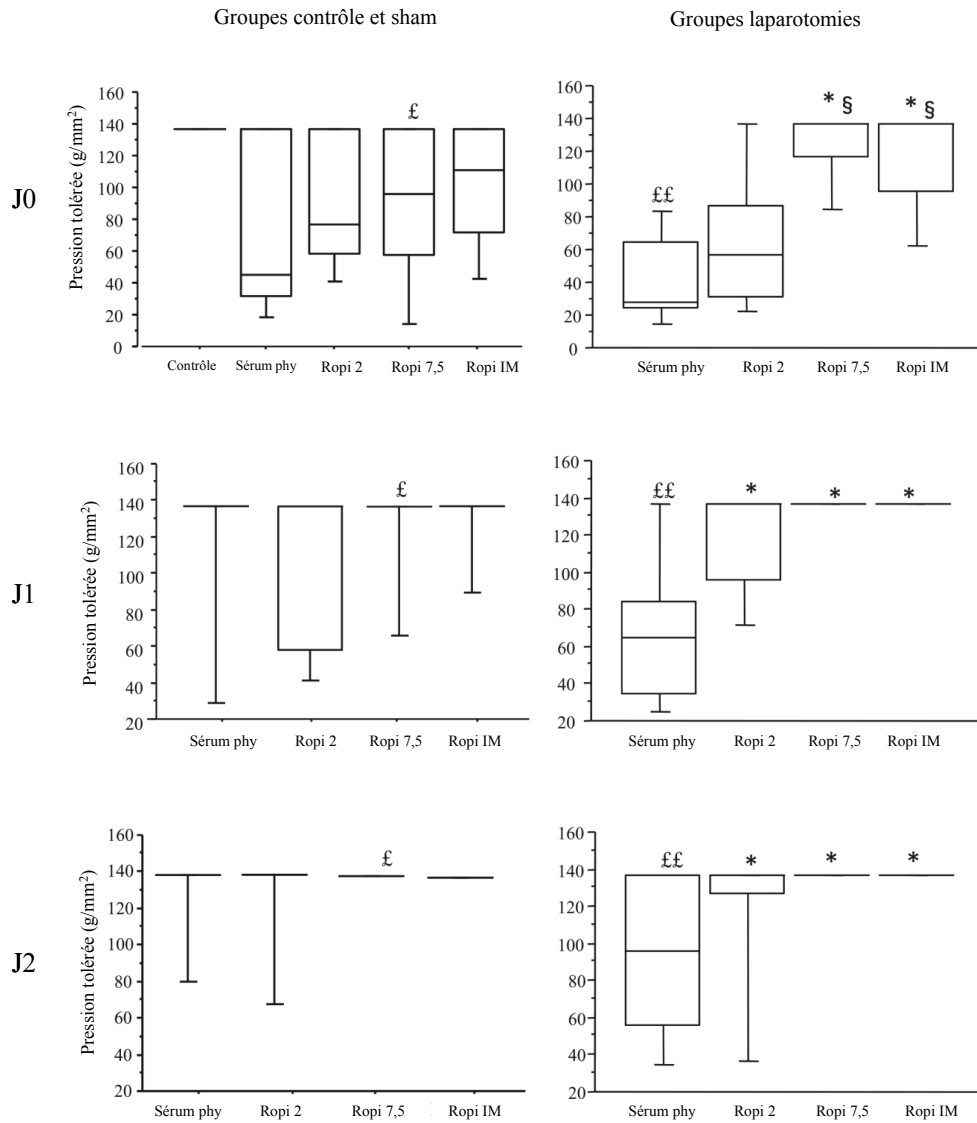


Figure 20- Pression pariétale (en g/mm^2) générant une douleur pariétale par application des filaments de von Frey sur 2 points de la plaie chirurgicale. Evaluation des groupes contrôle, sham opérés et laparotomie à J0 (a et b), J1 (c et d) et J2 (e et f). Les résultats sont représentés dans des boîtes à moustaches où sont représentés les 10^{ième}, 25^{ième}, 50^{ième}, 75^{ième} et 90^{ième} percentiles. Les points représentent les valeurs extrêmes
$p < 0,05$ vs les 4 groupes sham opérés
£ $p < 0,05$ et ££ $p < 0,01$ à travers le temps (J0 vs J1 vs J2)
* $p < 0,05$ vs groupe laparotomie sérum phy
§ $p < 0,05$ vs le groupe laparotomie Ropi 2

2.1.3. Comportement global (n = 11 à 12)

a- Groupes sham opérés

Dans le groupe contrôle, tous les animaux présentent des scores à 4, significativement différents du score des 4 autres groupes sham opérés ($p < 0,0001$).

Les autres groupes sham ne présentent aucune différence significative entre eux dans l'activité globale.

Les 4 groupes sham opérés récupèrent d'une façon significative dans le temps (J0 vs J1 vs J2).

b- Groupes laparotomie

Dans le groupe sérum phy, l'activité globale évolue de la même façon que la douleur pariétale et viscérale ; les scores sont donc plus élevés à J1 et à J2 en comparaison avec J0.

A J0, les scores observés sont plus élevés dans les groupes traités en comparaison avec le groupe sérum phy ce qui témoigne d'une récupération fonctionnelle post opératoire plus rapide dans les groupes traités.

A J1 et J2 les groupes traités présentent une différence significative avec le groupe sérum phy. Aucune différence significative n'est observée entre les groupes traités à J1 et à J2.

2.2. Production de cytokines (TNF- α et IL-1 β)

2.2.1. Production de TNF- α et d'IL-1 β après stimulation du sang total par du LPS (n = 8 à 10/groupe et par point d'évaluation) (Figure 21)

Après stimulation du sang total par du LPS, les concentrations de TNF- α et d'IL-1 β dans le surnageant sont très faibles ce qui écarte toute suspicion de stimulation des cytokines par les puits de culture.

a- Groupes sham

Les concentrations des cytokines sécrétées par les groupes sham ne présentent pas de différences significatives entre les groupes et dans le temps (J0, J1, et J2).

b- Groupes laparotomie

Dans le groupe sérum phy, seul le TNF- α (et non l'IL-1 β) augmente de manière significative sa concentration en fonction du temps.

A J0, les concentrations de TNF- α et d'IL-1 β ne présentent pas de différences significatives entre les groupes expérimentaux.

Les concentrations de TNF- α à J1 et J2 et de d'IL-1 β à J2 sont significativement plus basses dans le groupe Ropi IM en comparaison avec le groupe sérum phy.

Ces résultats sont en faveur d'un effet anti inflammatoire systémique de la ropivacaïne administrée par voie intramusculaire.

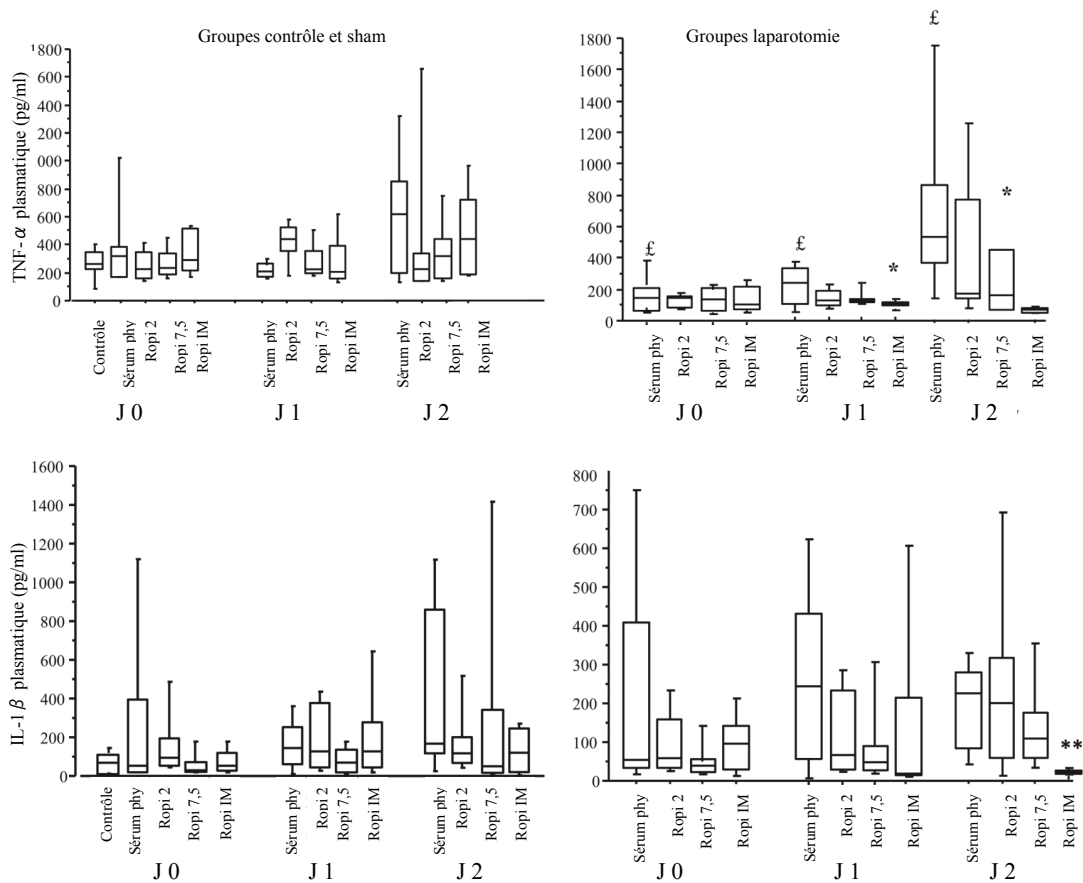


Figure 21- Concentrations de TNF- α et d'IL-1 β produits par les leucocytes *in vitro* après stimulation par du LPS. Les concentrations de ces deux cytokines sont représentées pour les groupes contrôle, sham opérés et laparotomie à J0, J1 et J2. Le sang total est stimulé avec du LPS pendant 24 heures et les cytokines sont dosées dans le surnageant. Les résultats sont représentés dans des boîtes à moustaches où sont représentés les 10^{ième}, 25^{ième}, 50^{ième}, 75^{ième} et 90^{ième} percentiles. Les points représentent les valeurs extrêmes
 £ $p < 0,05$ à travers le temps (J0 vs J1 vs J2)
 * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ vs groupe sérum phy

2.2.2. Production de TNF- α et d'IL-1 β par les macrophages du liquide péritonéal après stimulation par du LPS (n = 8 à 10/groupe et par point d'évaluation) (Figure 22)

a- Groupes sham

Dans les groupes sham, le nombre de cellules péritonéales récupéré est trop faible pour qu'elles puissent être stimulées (< 1 million de cellules/ml).

b- Groupes laparotomie

Dans le groupe sérum phy, les concentrations de TNF- α et d'IL-1 β augmentent significativement dans le temps.

A J0, il n'existe aucune différence significative dans la production des cytokines entre les groupes.

A J2, les concentrations de TNF- α sont significativement plus basses dans les groupes Ropi 7,5 et Ropi IM en comparaison avec le groupe sérum phy. A J2 également, la production d'IL-1 β est significativement plus basse dans le groupe Ropi IM en comparaison avec le groupe sérum phy.

Ces résultats sont en faveur d'un effet anti inflammatoire local exercé par la ropivacaïne administrée par voie systémique.

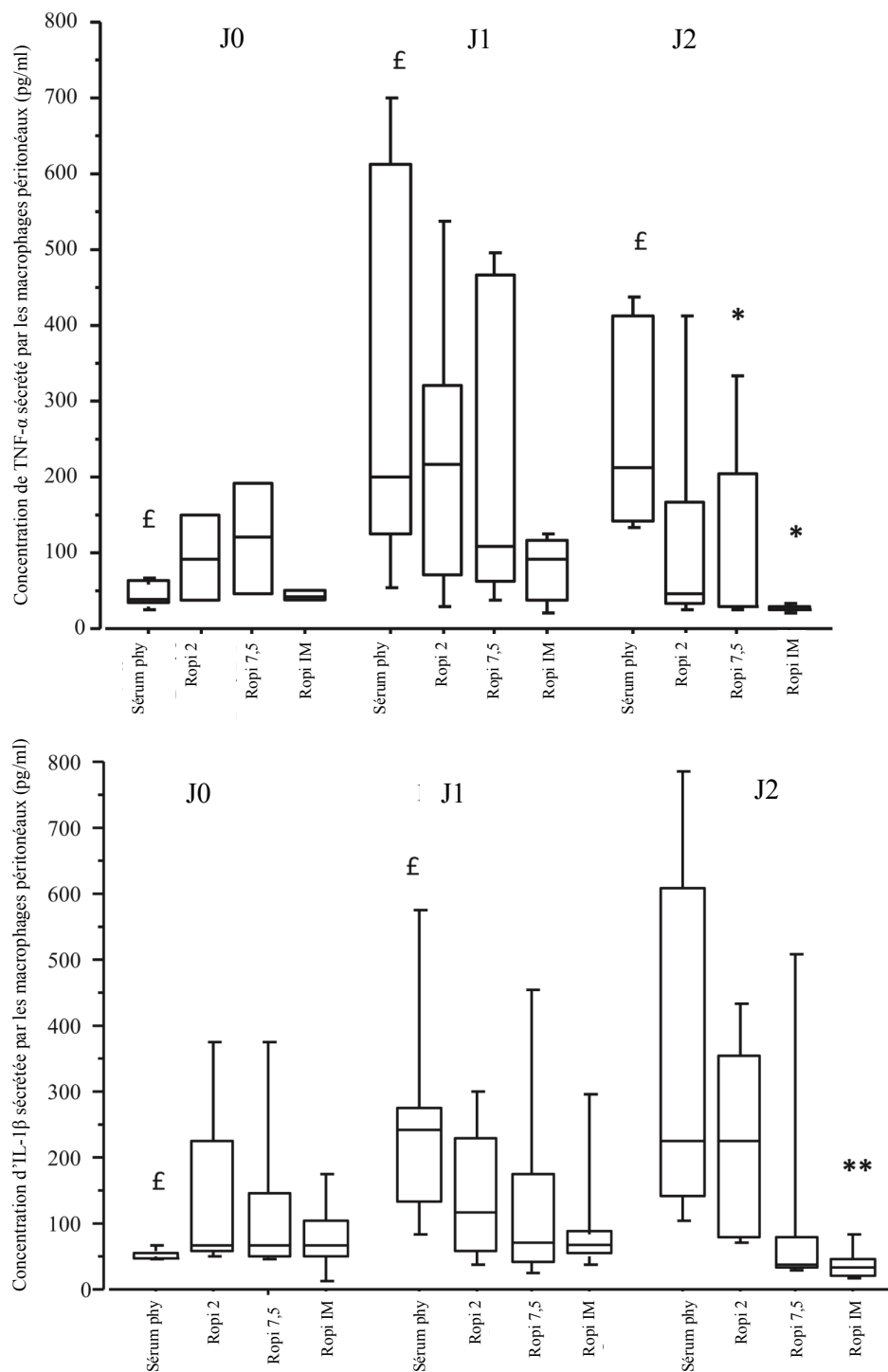


Figure 22- Concentrations de TNF- α et d'IL1- β produits par les macrophages péritonéaux dans les groupes de laparotomie à J0, J1 et J2. Les macrophages sont stimulés avec du LPS pendant 24 heures et les cytokines sont dosées dans le surnageant. Les résultats sont représentés dans des boîtes à moustaches où sont représentés les 10^{ème}, 25^{ème}, 50^{ème}, 75^{ème} et 90^{ème} percentiles. Les points représentent les valeurs extrêmes
 £ $p < 0,05$ ££ $p < 0,01$ à travers le temps (J0 vs J1 vs J2)
 * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ vs groupe sérum phy

2.3. Dosage de la concentration plasmatique de la ropivacaïne

La ropivacaïne n'est pas détectable dans le groupe sérum phy. Les concentrations plasmatiques de la ropivacaïne sont toujours extrêmement basses.

Quatre heures après la chirurgie, la concentration plasmatique de la ropivacaïne est de $0,06 \pm 0,06$ mg/l et $0,16 \pm 0,11$ mg/l dans les groupes Ropi 2 et Ropi 7,5, respectivement.

A la fin de la perfusion pré péritonéale (H24), la concentration de la ropivacaïne est de $0,03 \pm 0,03$ mg/l et $0,05 \pm 0,08$ mg/l pour les groupes Ropi 2 et Ropi 7,5, respectivement.

Dans le groupe Ropi IM, la concentration plasmatique de la ropivacaïne est de $0,42 \pm 0,49$ mg/l et de $0,44 \pm 0,27$ mg/l à 5 et 20 minutes de la première injection IM, respectivement.

La concentration plasmatique de la ropivacaïne 8 heures après la dernière injection intramusculaire dans le groupe Ropi IM et 24 heures après l'arrêt de la perfusion dans les deux groupes Ropi 2 et Ropi 7,5 est sous le seuil de détection de la technique utilisée.

3. Déroulement de l'étude 2

Cette étude a été réalisée en deux étapes :

(1) La première étape est une étude anatomique de l'innervation de la paroi abdominale chez le rat. Dans ce but, des rats sont disséqués, un bloc de la paroi abdominale du rat est imaginé (équivalent au bloc paravertébral) puis l'Indigo Carmin est injecté à travers les repères anatomiques proposés afin d'observer sa diffusion à proximité des nerfs impliqués dans l'innervation de la paroi abdominale.

(2) La deuxième étape correspond à une validation du bloc nerveux décrit plus haut en réalisant une étude comportementale et immunohistochimique. Dans ce but, une inflammation de la paroi abdominale a été induite chez le rat par injection dans la paroi abdominale de 0,5 ml de carragénine à 2,5% associée ou pas (selon les groupes expérimentaux) à une injection de bupivacaïne adrénalinée à 0,25% dans le bloc nerveux proposé. Six heures après l'induction de l'inflammation, la douleur pariétale a été évaluée par application croissante des filaments de von Frey au niveau des points d'injection de la carragénine dans la paroi abdominale des rats. Les rats destinés à l'étude immunohistochimique pour l'évaluation de l'expression de c-Fos au niveau la moelle épinière et du tronc cérébral ont été prélevés 2 heures après l'induction de l'inflammation au niveau de la paroi abdominale (Tableau 5).

Tableau 5- Groupes expérimentaux de la deuxième partie de l'étude 2

Groupes	Carragénine injectée dans la paroi abdominale	Bupivacaïne par bloc
Bupivacaïne	+	+
Contrôle	+	-

4. Résultats de l'étude 2

4.1. Résultats de l'étude anatomique

La dissection anatomique de 3 rats a montré que la paroi abdominale du rat était innervée par les racines nerveuses spinales de T5 à S1. Les racines nerveuses passent au-dessous des muscles paravertébraux avant de pénétrer entre le muscle oblique interne et le muscle transverse (Figure 23).

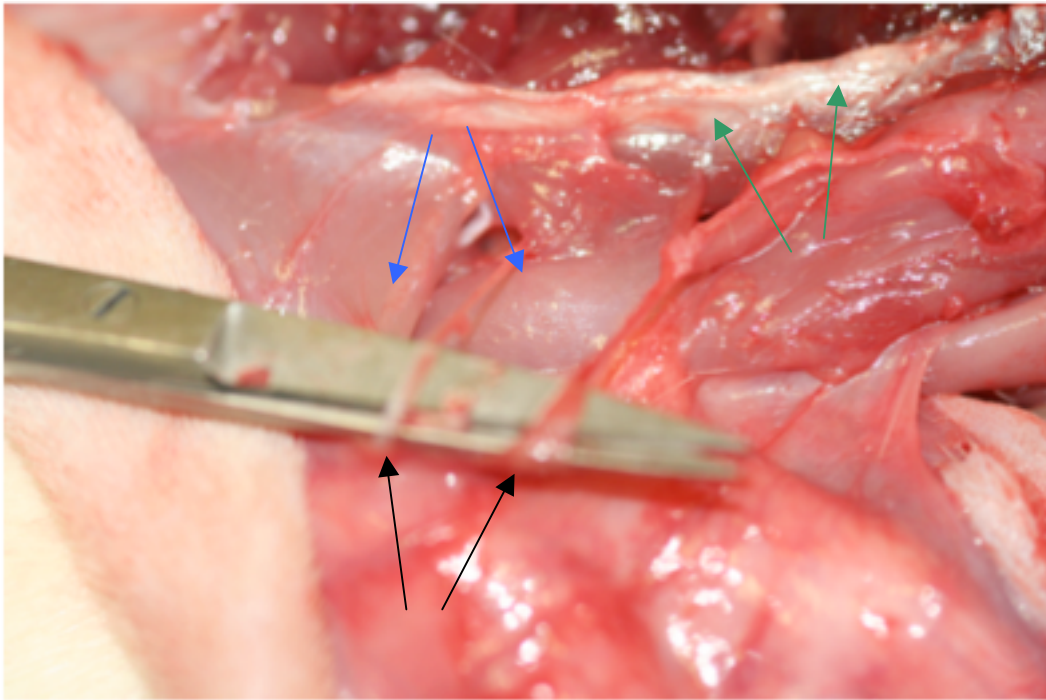


Figure 23- Innervation de la paroi abdominale du rat. On observe un passage des racines nerveuses (2 flèches noires) qui sortent de la moelle épinière et passent sous les muscles paravertébraux (2 flèches bleues) avant d'aller innover les muscles de la paroi abdominale. Les flèches vertes montrent la colonne vertébrale.



Figure 24- Diffusion de l'Indigo Carmin dans les muscles paravertébraux du rat. Les points de ponction du bloc de la paroi abdominale proposé sont marqués avec de l'Indigo Carmin (3 flèches noires) du côté droit de la colonne vertébrale après incision de la peau.

Après injection de l'Indigo Carmin dilué, la dissection de deux autres rats montre que l'injection de la solution après le passage par l'aiguille de la première couche musculaire assure une diffusion péri nerveuse. L'injection d'un petit volume sur plusieurs points d'injection assure une diffusion péri nerveuse de la solution et évite une diffusion vers l'espace péri dural, intra thoracique ou intra abdominal (Figures 24 et 25).

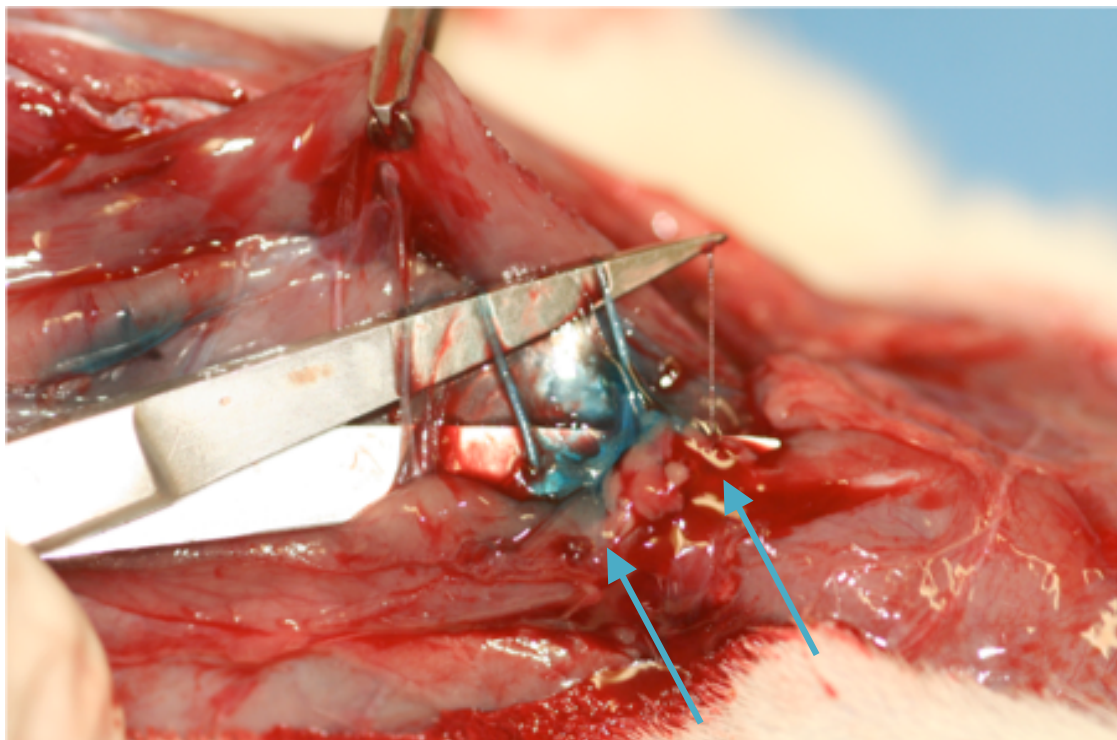


Figure 25- Imprégnation nerveuse à l'Indigo Carmin. Diffusion péri nerveuse de la solution diluée d'Indigo Carmin injectée par voie transcutanée après passage à travers le muscle paravertébral (flèches bleues).

4.2. Effets du bloc de la paroi abdominale sur la douleur pariétale par application des filaments de von Frey après une inflammation induite à la carragénine (n = 7/groupe)

L'évaluation de la douleur pariétale par application des filaments de von Frey montre que tous les animaux dans les deux groupes expérimentaux (carragénine dans la paroi abdominale avec et sans bloc de la paroi) tolèrent la pression maximale appliquée de 137,3 g/mm².

Six heures après l'induction de l'inflammation par la carragénine, les animaux dans le groupe bupivacaïne montrent un seuil de tolérance de la douleur significativement plus élevé que dans le groupe contrôle (Figure 26 et Tableau 5).

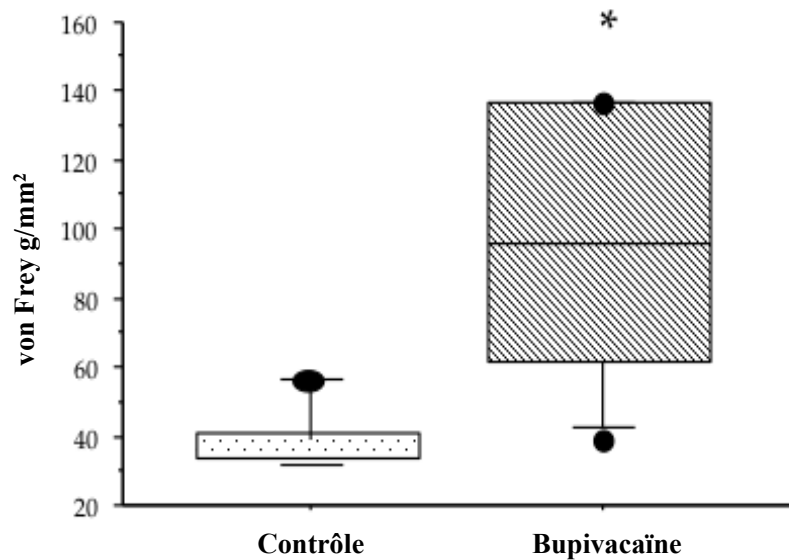


Figure 26- Effet de la bupivacaïne injectée par voie paravertébrale sur la douleur pariétale. Le groupe bupivacaïne/carragénine tolère des pressions pariétales supérieures à celles tolérées par le groupe contrôle carragénine seule. Les résultats sont représentés dans des boîtes à moustaches où sont représentés les 10^{ième}, 25^{ième}, 50^{ième}, 75^{ième} et 90^{ième} percentiles. Les points représentent les valeurs extrêmes
 * $p < 0,05$ vs le groupe contrôle

4.3. Effets de la bupivacaïne par voie paravertébrale sur l'expression médullaire de c-Fos (n = 8/groupe)

L'étude immunohistochimique de c-Fos à différents niveaux de la moelle épinière montre une diminution significative de son expression dans le groupe bupivacaïne en comparaison au groupe contrôle. Cette diminution de l'expression de c-Fos est en faveur d'une diminution de la transmission de la nociception dans le groupe bupivacaïne (Figure 27 et Tableau 5).

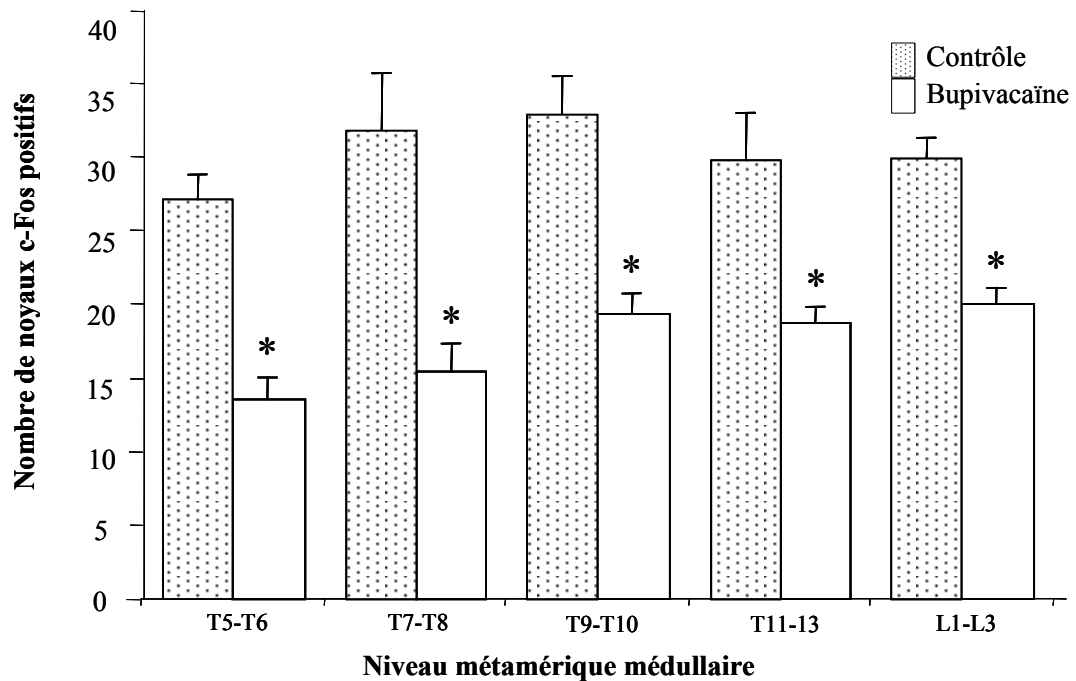


Figure 27- Effet de la bupivacaïne administrée par voie paravertébrale sur le niveau d'expression de c-Fos au niveau de la moelle épinière après une inflammation pariétale. La bupivacaïne/carragénine entraîne une diminution significative de l'expression de c-Fos en comparaison avec le groupe contrôle carragénine seule. Les résultats sont représentés en nombre moyen de noyaux +/- sem (écart standard à la moyenne)

* $p < 0,05$ vs groupe contrôle

5. Déroulement de l'étude 3

Cette étude a été réalisée en deux étapes :

(1) Dans la première étape, l'effet de la bupivacaïne par le bloc de la paroi abdominale proposé et validé plus haut dans l'étude 2 a été évalué sur les 2 composantes de la douleur abdominale (pariétale et viscérale). Dans ce but, les rats ont été randomisés en 4 groupes en fonction du type de l'inflammation induite (péritonéale ou pariétale) et du bloc réalisé (bupivacaïne en microsphères ou véhicule) selon le tableau 6 : carragénine intra péritonéale et bloc avec bupivacaïne, carragénine intra péritonéale et bloc avec véhicule, carragénine intra pariétale et bloc avec bupivacaïne et carragénine intra pariétale et bloc avec véhicule (Tableau 6). Des prélèvements tissulaires (moelle épinière et tronc cérébral) ont été réalisés 2 et 48 heures après l'induction de l'inflammation pour réaliser une étude immunohistochimique avec une révélation de c-Fos et de TNF- α .

Tableau 6- Groupes expérimentaux dans la première étape expérimentale de l'étude 3. abdo : abdominale ; bupi : bupivacaïne ; Carr : carragénine ; IP : intra péritonéale ; PA : paroi abdominale ; véhic : véhicule

Groupes	Carragénine IP	Carragénine PA	Bupivacaïne bloc
Carr IP bupi	+	-	+
Carr IP véhic	+	-	-
Carr PA bupi	-	+	+
Carr PA véhic	-	+	-

(2) Dans la deuxième étape, une comparaison de l'effet de la bupivacaïne par voie intramusculaire (systémique) par rapport à l'effet de la vagotomie a été réalisée. Dans ce but, les rats ont été randomisés selon les groupes suivants (Tableau 7) :

- carragénine intra péritonéale + bupivacaïne IM + véhicule sur le nerf vague.

- Carragénine intra péritonéale + véhicule IM + véhicule sur le nerf vague.
- Carragénine intra péritonéale + bupivacaïne IM + vagotomie.
- Carragénine intra péritonéale + véhicule IM + vagotomie.

Dans cette série d'expérience, les rats ont reçu sous anesthésie générale à l'isoflurane, une injection d'éthanol ou véhicule au niveau cervical selon le groupe expérimental (technique de vagotomie déjà décrite). Deux jours après, les rats ont subi une injection intramusculaire de bupivacaïne en microsphères ou de véhicule avant l'induction de la péritonite chimique par injection de 1 ml de carragénine à 3% en intrapéritonéal. Les rats ont été prélevés selon le marqueur immunohistochimique étudié à 2 ou 48 heures après l'induction de l'inflammation (Figure 28).

Tableau 7- Groupes expérimentaux de la deuxième étape expérimentale de l'étude 3. ctrl : contrôle ; Périt : péritonite ; vago : vagotomie ; bupi : bupivacaïne

Groupes	Carragénine IP	Vagotomie	Bupivacaïne IM
Périt ctrl	+	-	-
Vago ctrl	-	+	-
Vago perit	+	+	-
Périt bupi	+	-	+
Vago perit bupi	+	+	+

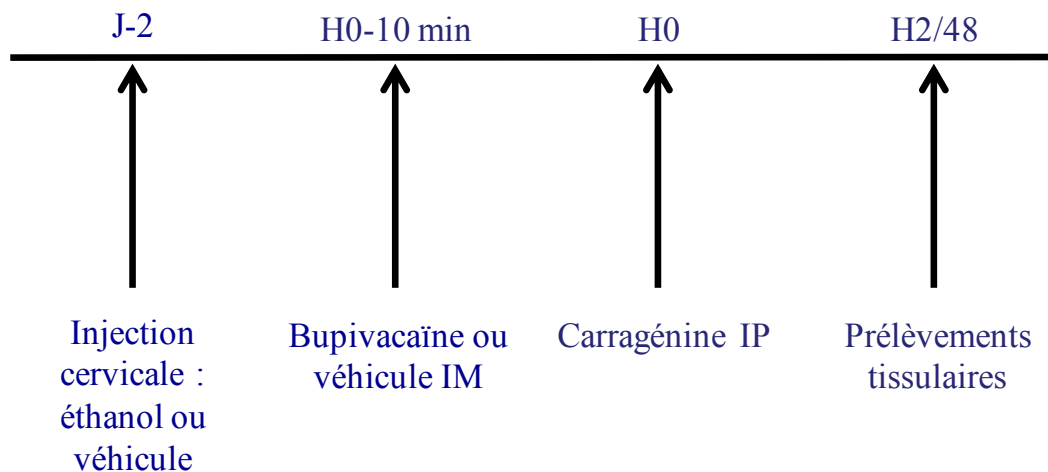


Figure 28- Déroulement des expériences de la deuxième étape de l'étude 3. IM : intramusculaire ; IP : intrapéritonéale

6. Résultats de l'étude 3

6.1. Effet de la bupivacaïne par voie paravertébrale sur l'expression de c-Fos au niveau médullaire et tronculaire (noyau solitaire) après une inflammation pariétale ou péritonéale chez le rat (n = 8/groupe)

Les microsphères de bupivacaïne injectées par voie paravertébrale entraînent une diminution significative de l'expression de c-Fos au niveau médullaire et tronculaire. Cette diminution du niveau de la transmission de la nociception est retrouvée aussi bien dans le cas d'une inflammation induite par la carragénine au niveau de la paroi abdominale qu'au niveau intra péritonéal (Figures 29 et 30).

Ces résultats montrent une efficacité du bloc paravertébral chez le rat qui diminue la transmission de la nociception vers la moelle épinière et le tronc cérébral lors d'une inflammation pariétale ou péritonéale.

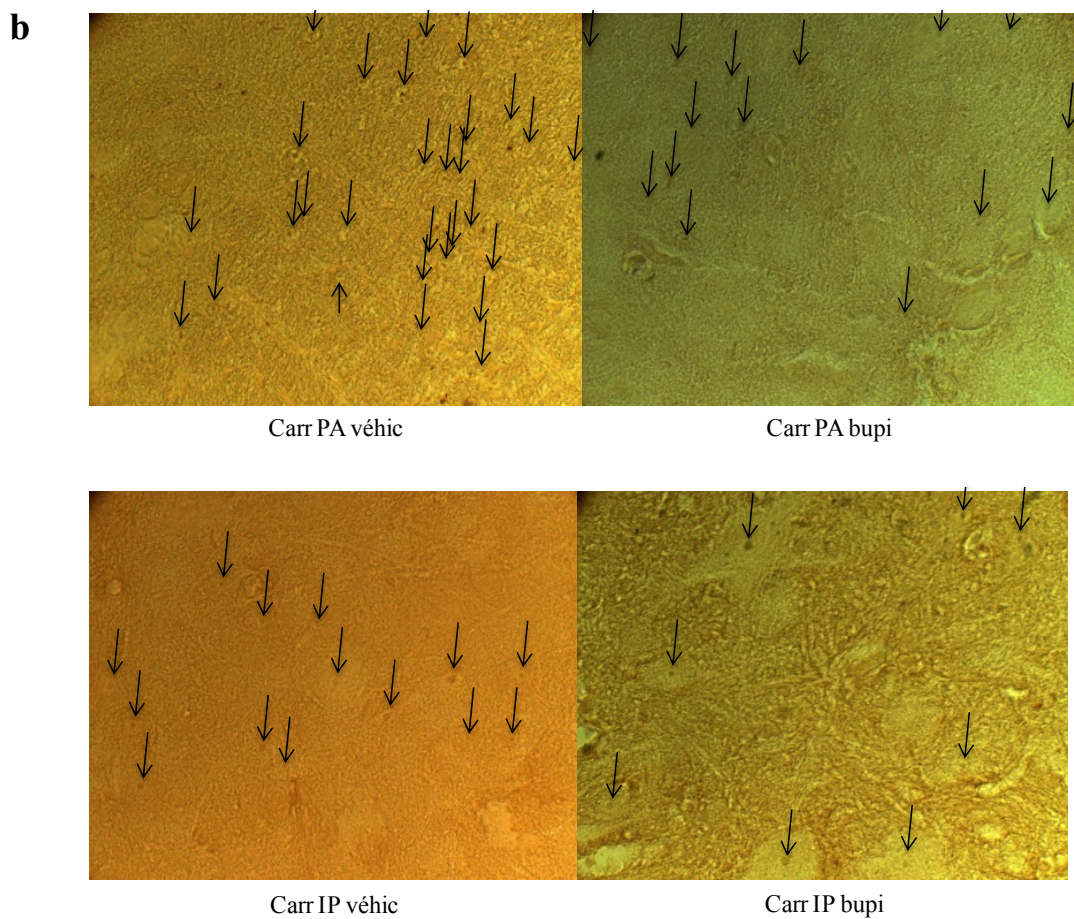
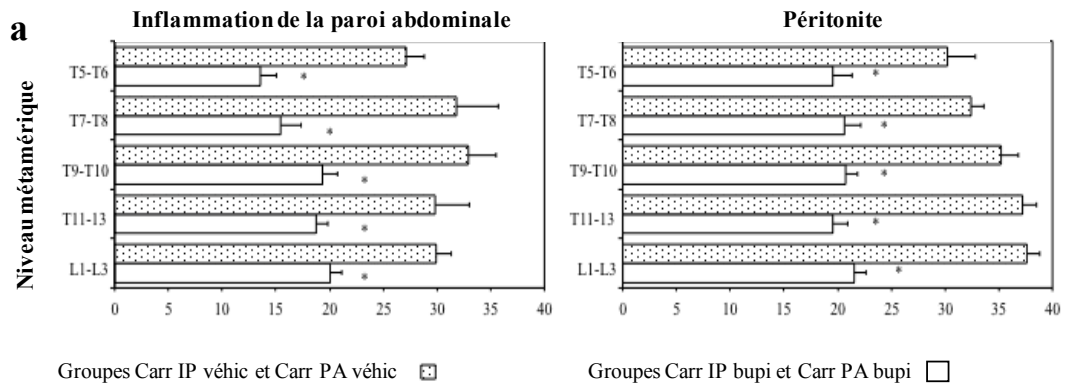


Figure 29- Expression de c-Fos au niveau de la moelle épinière au cours de l'inflammation de la paroi abdominale ou intra péritonéale. (a) Diminution de l'expression de c-Fos au niveau des différents métamères de la moelle épinière dans les groupes bupivacaïne (bupi) en comparaison avec les groupes véhicules (véhic) dans l'inflammation de la paroi abdominale (à gauche) ou de l'inflammation intra péritonéale (à droite). Les résultats sont représentés en nombre moyen de noyaux + sem * $p < 0,0001$ vs groupes véhicules. (b) Représentation schématique de l'expression médullaire immunohistochimique de c-Fos. Les noyaux marqués par c-Fos sont pointés par les petites flèches. Les groupes traités par bupi (partie droite) montrent un nombre moins important de noyaux c-Fos marqués au niveau médullaire par rapport aux groupes non traités (partie gauche)

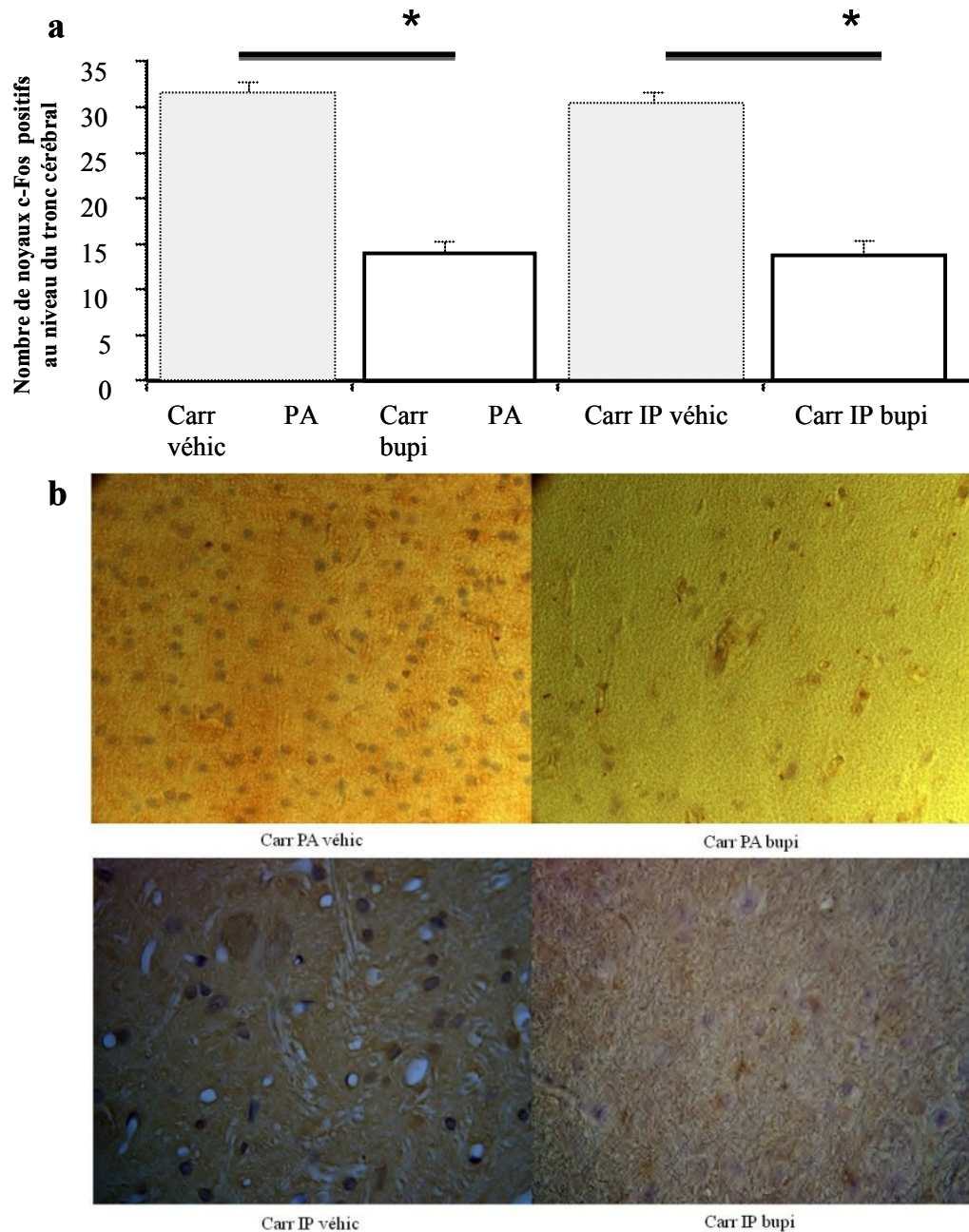


Figure 30- Expression de c-Fos au niveau du noyau solitaire au cours de l'inflammation de la paroi abdominale ou intra péritonéale. (a) Diminution significative de l'expression de c-Fos au niveau du noyau solitaire dans les groupes bupivacaïne (bupi) en comparaison avec les groupes véhicule (véhic) dans l'inflammation de la paroi abdominale (deux colonnes à gauche) ou de l'inflammation intra péritonéale (deux colonnes à droite). Les résultats sont représentés en nombre moyen de noyaux + sem. * $p < 0,0001$ vs groupes véhicules. Pas de différence significative observée entre les groupes ayant subi une inflammation de la paroi abdominale (PA) et les groupes ayant subi une inflammation intra péritonéale (IP). (b) Représentation schématique de l'expression tronculaire immunohistochimique de c-Fos. Les noyaux marqués par c-Fos apparaissent sous forme de grands points foncés. Les groupes traités par bupi (partie droite) montrent un nombre moins important de noyaux c-Fos marqués au niveau tronculaire par rapport aux groupes non traités (partie gauche).

6.2. Effet de la bupivacaïne par voie systémique et de la vagotomie droite préventive sur l'expression tronculaire (au niveau du noyau solitaire) de c-Fos suite à une péritonite à la carragénine (n = 8/groupe)

Les microsphères de bupivacaïne injectés par voie IM (systémique) entraînent une diminution significative de l'expression de c-Fos au niveau des 2 noyaux solitaires droit et gauche du tronc cérébral en comparaison avec le groupe péritonite contrôle qui n'a pas reçu de bupivacaïne.

Ces résultats sont en faveur d'un effet systémique de la bupivacaïne sur la transmission de la nociception tronculaire lors d'une péritonite chimique chez le rat.

La réalisation d'une vagotomie droite 48 heures avant le déclenchement de la péritonite par injection de carragénine, diminue l'expression tronculaire de c-Fos au niveau des deux noyaux solitaires droit et gauche en comparaison avec le groupe péritonite contrôle.

L'effet bilatéral de la vagotomie droite sur l'expression de c-Fos peut s'expliquer par la multitude des anastomoses intra thoraciques entre les 2 nerfs vagues droit et gauche (20% d'anastomoses entre les 2 nerfs vagues existent chez le rat).

L'association de la vagotomie droite et de la bupivacaïne par voie systémique diminue significativement l'expression tronculaire de c-Fos en comparaison avec le groupe péritonite contrôle.

Il n'existe pas de différence significative dans l'expression tronculaire de c-Fos entre les différents groupes traités par bupivacaïne ou par vagotomie (Figure 31).

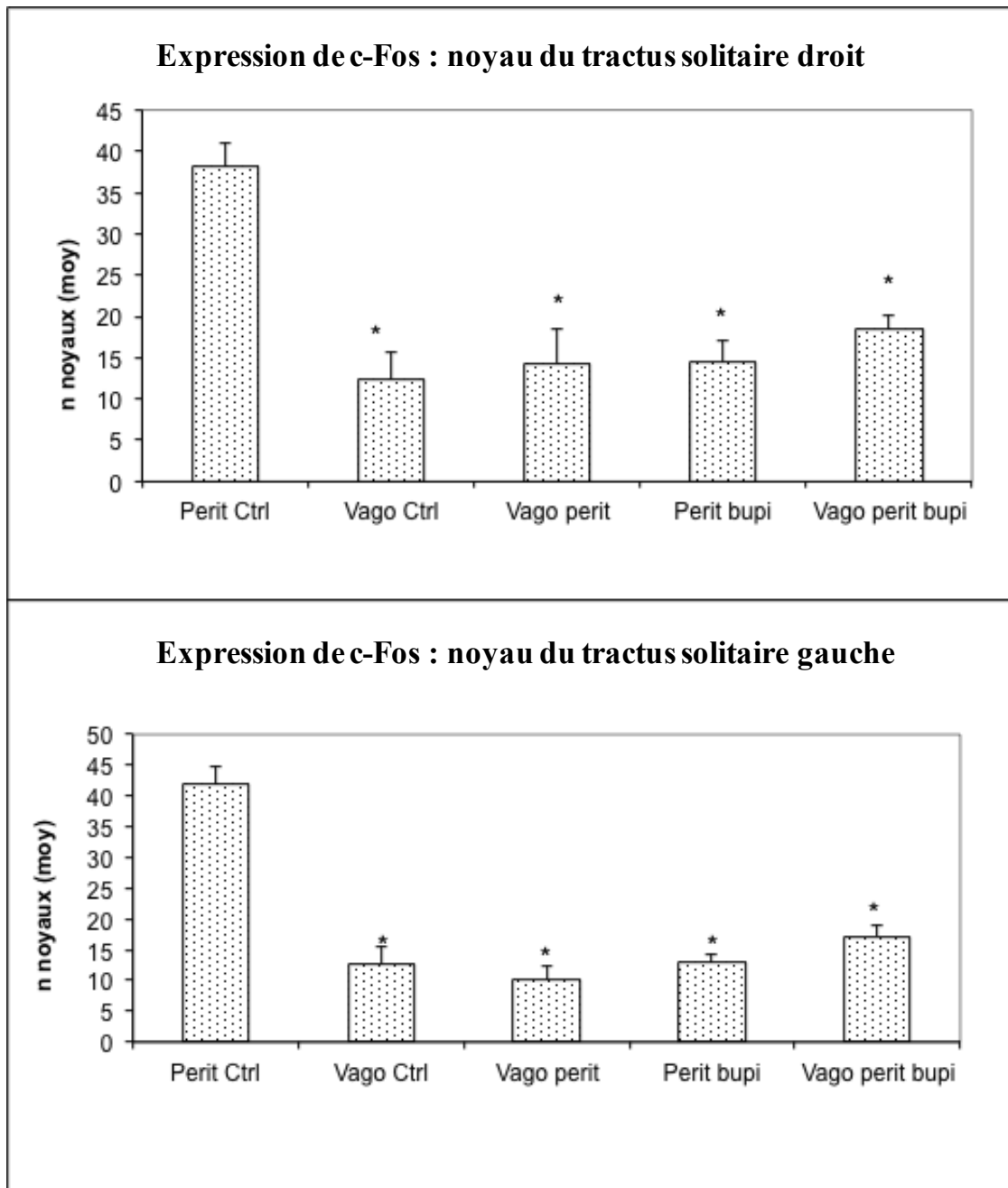


Figure 31- Expression tronculaire de c-Fos au niveau des noyaux du tractus solitaire droit (partie supérieure de la figure) et gauche (partie inférieure de la figure) 2 heures après une péritonite chimique à la carragénine. Les groupes traités par bupivacaïne par voie systémique ou par vagotomie préventive présentent une diminution significative de l'expression bilatérale de c-Fos en comparaison avec le groupe péritonite contrôle. Les résultats sont représentés en nombre moyen de noyaux + sem

* $p < 0,0001$ vs groupe péritonite contrôle

V- DISCUSSION

1. Synthèse des résultats

L'utilisation des AL dans la chirurgie abdominale est une pratique clinique assez courante. En plus de l'utilisation de la lidocaïne par voie intraveineuse, deux techniques d'anesthésie locorégionale sont largement utilisées depuis quelques années en chirurgie abdominale. Ces deux techniques sont (1) l'insertion des cathéters d'infiltration dans les plaies chirurgicales et (2) les blocs de la paroi abdominale (TAP bloc du plan du muscle transverse ou bloc paravertébral).

L'efficacité des cathéters d'infiltration est variable en fonction du type de chirurgie et de la position du cathéter dans la paroi abdominale. Dans une laparotomie, un cathéter posé dans le plan sous cutané est très peu efficace contre la douleur alors qu'un cathéter pré péritonéal diminue la consommation de morphine, la durée d'hospitalisation et les scores de douleur durant l'hospitalisation (Beaussier, El'Ayoubi et al. 2007).

Les blocs de la paroi abdominale sont également efficaces dans différents types de chirurgie abdominale y compris par la coelioscopie.

Les mécanismes d'action des AL au cours de ces deux techniques d'ALR ne sont pas complètement élucidés et n'ont jamais été comparés à leurs effets systémiques.

Dans la première étude, l'administration de ropivacaïne à forte dose par voie pré péritonéale ou par voie systémique entraîne un effet comparable sur la réduction de la douleur pariétale et viscérale. L'utilisation de la ropivacaïne par voie systémique présente un effet anti inflammatoire systémique (plasmatique) et local (péritonéal) supérieur à celui de la voie pré péritonéale.

Dans l'étude 3, la bupivacaïne administrée par voie locorégionale ou systémique entraîne une diminution de la transmission de la nociception médullaire et tronculaire dans les deux types d'inflammation pariétale ou péritonéale.

Au cours des études 2 et 3, nous avons étudié l'expression médullaire et tronculaire de c-Fos afin d'évaluer la transmission de la nociception vers le SNC et

l'effet des AL sur cette transmission dans notre modèle expérimental. En effet, c-Fos est un simple marqueur lié à la transduction d'un signal d'agression donnant lieu à l'expression de la protéine c-Fos par le proto-oncogène c-fos. L'expression de c-Fos est maximale deux heures après la stimulation nociceptive et correspond donc à une stimulation non spécifique. Il n'existe pas dans nos travaux de groupe témoin concernant l'expression de c-Fos car le simple geste d'anesthésie même par inhalation provoque une stimulation de l'expression de c-Fos (Lanteri-Minet, Isnardon et al. 1993).

Contrairement à ce qui est connu chez l'homme concernant l'utilisation de la lidocaïne par voie IV avec une concentration plasmatique de lidocaïne supposée être stable, nous avons utilisé lors de nos travaux la voie IM. Cette voie IM suppose une absorption des AL avec un pic plasmatique. Ce pic plasmatique peut être à l'origine du succès de la voie systémique dans nos travaux. Nous avons recherché le « pic plasmatique » de la ropivacaïne dans l'étude 1 sans réussite. Cependant, la concentration plasmatique efficace des AL dans les pathologies abdominales n'est pas connue. Elle doit être suffisamment élevée pour atteindre les cellules et les organes cibles sans atteindre les concentrations plasmatiques toxiques connues des AL.

2. Mécanismes d'action des deux techniques d'ALR évaluées

Les mécanismes d'action des deux techniques d'ALR proposées supposent que le blocage des afférences nociceptives de la paroi abdominale entraînerait une inhibition de la douleur viscérale et du phénomène de sensibilisation centrale. En effet, un bloc nerveux entraîne une inhibition du transport axonal des médiateurs de l'inflammation (Deruddre, Combettes et al. 2010).

L'administration des AL par un cathéter pré péritonéal peut avoir un effet bloquant sur les afférences médullaires par infiltration directe du péritoine par les AL mais aussi par un effet systémique dû à l'absorption par le péritoine richement vascularisé.

Un bloc de la paroi abdominale diminue la transmission de la nociception par

action directe sur les racines nerveuses médullaires de la paroi abdominale comme ressemble un bloc nerveux périphérique et par un effet systémique qui ne peut être écarté.

L'utilisation de cathéters d'infiltration pré péritonéales et des blocs de la paroi abdominale en post opératoire de laparotomie repose sur l'hypothèse selon laquelle les afférences pariétales jouent un rôle majeur dans la douleur globale et dans les conséquences physiopathologiques de la chirurgie.

En pratique, la distinction entre douleur viscérale et douleur pariétale est difficile.

La douleur viscérale est souvent mal localisée, irradiée ou transférée à un site cutané et provoque généralement de fortes réponses autonomes et émotives ainsi que des contractions musculaires toniques.

Ceci implique plusieurs mécanismes : (1) les afférences nerveuses provenant des viscères sont relativement moins nombreuses que les afférences cutanées et ne constituent que 2 à 15% de la totalité des afférences arrivant à la moelle épinière (Ness and Gebhart 1990). (2) D'autre part, tous les interneurons médullaires recevant des afférences viscérales reçoivent également des afférences cutanées et possèdent ainsi un caractère « viscéro cutané ». Par contre, tous les interneurons recevant des afférences cutanées ne reçoivent pas des afférences viscérales et possèdent un caractère simplement « cutané ». (3) Par ailleurs, en plus des convergences médullaires viscéro cutanées, il existe des convergences viscéro viscérales vers les mêmes interneurons ce qui explique, par exemple, la confusion clinique entre une douleur angineuse et une douleur vésiculaire. De plus, Ness et Gebhart ont démontré qu'il existait une convergence entre les afférences provenant du vagin, du col utérin, de la vessie, du colon descendant et de la peau (Ness and Gebhart 1990).

Des données expérimentales animales ont montré que la douleur pariétale pourrait sensibiliser les neurones médullaires à une douleur colique viscérale (Miranda, Peles et al. 2004). Il existe une sensibilisation croisée ou « *cross sensitization* » entre les structures viscérales et non viscérales après chirurgie expérimentale. Ainsi, une incision plantaire dans un modèle de douleur et d'hyperalgésie entraîne, non seulement

une hyperalgésie plantaire mais aussi une hypersensibilité colique caractérisée par une réponse exagérée à la distension colique (Cameron, Brennan et al. 2008).

Cependant, il n'a jamais été clairement démontré que l'inhibition de la douleur pariétale pourrait inhiber la douleur viscérale. Dans le modèle de distension colique utilisé au cours de l'étude 1, il a été montré que quatre populations de neurones médullaires thoraco lombaires étaient impliquées dans la réponse. Trois d'entre elles reçoivent des convergences cutanées dont la stimulation peut activer ou inhiber les cellules nerveuses (Ness and Gebhart 1990; Ness and Gebhart 1991).

Au cours de l'étude 1, la douleur pariétale mesurée par des filaments de von Frey après laparotomie est inhibée par une infiltration continue de ropivacaïne pré péritonéale. En effet, à J0 et J1, les niveaux de douleur sont significativement diminués par rapport au groupe contrôle. De façon parallèle, la douleur viscérale mesurée par distension colique est diminuée significativement. Ces résultats montrent que l'inhibition de la douleur pariétale par une infiltration de ropivacaïne inhibe la douleur viscérale confirmant notre hypothèse physiopathologique. Les résultats de l'étude 3 confirment les résultats de l'étude 1. Ainsi, un bloc de la paroi abdominale avec des AL entraîne une diminution de la transmission médullaire et tronculaire de la nociception par inhibition de l'expression de c-Fos et donc diminue la douleur en cas d'inflammation viscérale isolée. L'échelle clinique de la douleur globale (étude 1) confirme également ces résultats. En effet, 48 heures après la chirurgie, les animaux du groupe contrôle récupèrent des niveaux de douleur très faibles, proches de la situation pré opératoire. Il n'existe alors pas de différence avec les animaux ayant reçu une infiltration pré péritonéale.

En ce qui concerne l'administration par infiltration, l'effet analgésique que nous avons observé après infiltration pré péritonéale est partiellement associé à un effet sur l'inflammation. Dans ce cas, les autres mécanismes impliqués restent à définir.

Les concentrations plasmatiques de ropivacaïne mesurées au cours de l'infiltration pré péritonéale sont très faibles et donc en faveur d'un effet « local » par inhibition des afférences pariétales et non « systémique ». Cependant, cet effet systémique ne peut être complètement écarté surtout sur les cellules nerveuses, notamment la microglie,

où les concentrations efficaces nécessaires sont relativement faibles (Toda, Sakai et al. 2011; Block, Jorneberg et al. 2013; Yuan, Li et al. 2014).

3. Mécanismes d'action des AL par voie systémique

Afin de confirmer notre hypothèse physiopathologique, nous avons comparé les effets des AL administrés par voie systémique ou par voie locorégionale.

En effet, il existe de nombreuses publications montrant l'intérêt de la lidocaïne par voie intraveineuse au cours de la chirurgie colique chez les patients. La lidocaïne administrée par voie intraveineuse, notamment au cours de la chirurgie colique ou prostatique, permet une analgésie avec une épargne morphinique, une diminution de la durée du séjour d'hospitalisation, une reprise plus précoce du transit et une réhabilitation post opératoire plus rapide (Groudine, Fisher et al. 1998; Herroeder, Pecher et al. 2007; Marret, Rolin et al. 2008).

De plus, la lidocaïne diminue de façon significative la libération de cytokines notamment l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-1ra, l'activation du complément (C3a) et la diminution de la sous-unité de l'intégrine en post opératoire (Kuo, Jao et al. 2006; Herroeder, Pecher et al. 2007).

La lidocaïne agirait sur les nocicepteurs qui participent au phénomène de sensibilisation centrale qui sont sensibles à de faibles doses de lidocaïne (Koppert, Weigand et al. 2004).

Des études expérimentales ont montré que la lidocaïne provoquait une augmentation de la motilité intestinale par effet direct sur les cellules musculaires lisses ou par suppression de l'effet nerveux inhibiteur intrinsèque (Biber and Fara 1973; Bortoff and Muller 1975). L'effet de la lidocaïne par voie systémique sur la récupération rapide du transit intestinal après une chirurgie abdominale peut être également dû à une diminution de la réponse inflammatoire et du tonus sympathique.

Au cours de nos études, les animaux recevant une administration systémique

d'AL présentent des niveaux de douleur pariétale et viscérale ainsi qu'une expression médullaire et tronculaire de c-Fos significativement inférieurs aux groupes contrôle.

Il existe une analgésie pariétale et viscérale comparable aux animaux ayant reçu une infiltration pré péritonéale après une laparotomie (groupe Ropi 7,5 dans l'étude 1) et une diminution de l'expression médullaire et tronculaire de c-Fos comparable au bloc de la paroi abdominale dans le cas d'une péritonite (étude 3).

Les concentrations plasmatiques de ropivacaïne IM sont nettement plus élevées que dans les groupes contrôle ou infiltration, et donc compatibles avec un effet systémique.

Les mécanismes mis en jeu sont clairement différents :

(1) l'infiltration pré péritonéale permet une analgésie par inhibition locale des afférences pariétales ce qui permettrait une inhibition de la douleur viscérale.

(2) L'effet analgésique de l'administration systémique fait intervenir une diminution de la libération des neuropeptides périphériques, de l'hyperalgésie centrale, de la sensibilité des nocicepteurs et des médiateurs de l'inflammation systémique (Koppert, Zeck et al. 1998; Koppert, Ostermeier et al. 2000; Herroeder, Pecher et al. 2007).

4. Effet des AL sur l'inflammation

Les deux techniques ALR utilisées dans nos travaux *versus* systémique semblent être efficaces de façon équivalente en termes d'analgésie au décours d'une laparotomie.

Par ailleurs, l'inflammation étant un acteur principal de la douleur, nous avons complété notre premier travail par une étude des effets des différentes techniques d'analgésie sur les médiateurs de l'inflammation. Toute manipulation de la cavité abdominale provoque une inflammation locale et systémique (Jesch, Kuebler et al. 2006). Les AL possèdent des propriétés anti inflammatoires intrinsèques et peuvent moduler la réponse inflammatoire (Hollmann and Durieux 2000). Ainsi, la lidocaïne

diminue de façon significative la libération de cytokines en post opératoire (Herroeder, Pecher et al. 2007). De plus, la ropivacaïne atténue l'inflammation créée *in vitro* sur des cellules épithéliales de rats. *In vivo*, la ropivacaïne réduit l'inflammation du liquide broncho alvéolaire chez les rats et diminue l'inflammation pulmonaire lors d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë (Blumenthal, Borgeat et al. 2006; Piegeler, Dull et al. 2014). D'autre part, la bupivacaïne, administrée par voie intramusculaire, peut modifier la réponse inflammatoire systémique secondaire à une injection de carragénine dans la patte du rat (Beloeil, Ababneh et al. 2006). Les AL exercent ainsi leurs effets anti inflammatoires non seulement en bloquant les canaux sodiques mais aussi en exerçant un effet cellulaire direct. En effet, Leduc et al. ont mis en évidence des propriétés anti oxydantes de la bupivacaïne sur la peroxydation lipidique associée à l'inflammation induite par la carragénine (Leduc, Gentili et al. 2002). De plus, Hollmann et al. ont démontré que les AL, administrés à des concentrations proches de celles utilisées en clinique, inhibaient la production d'anion superoxyde par les polynucléaires neutrophiles par un mécanisme impliquant la voie de signalisation associée aux récepteurs transmembranaires couplés à la protéine G (Hollmann, Herroeder et al. 2004). L'effet anti inflammatoire des AL peut être attribué également à une inhibition directe de la mobilité des macrophages et de la production des cytokines en réponse à des concentrations croissantes de lidocaïne (Dickstein, Kiremidjian-Schumacher et al. 1984). Récemment, Piegeler a démontré que l'effet anti inflammatoire de la lidocaïne et de la ropivacaïne passait par une diminution de la réponse cellulaire au TNF- α . Cet effet se traduit par une inhibition de la voie de signalisation Src et donc par une diminution de l'expression d'ICAM-1, une diminution de la phosphorylation de la cavéoline 1 et une stabilisation de la membrane endothéliale vasculaire (Piegeler, Dull et al. 2014). Au niveau du SNC la lidocaïne atténue la réponse inflammatoire microgliale induite par le LPS et la bupivacaïne à très faible concentration diminue la réactivité des astrocytes stimulés également par du LPS (Block, Jorneberg et al. 2013; Yuan, Li et al. 2014). Les mécanismes impliqués dans l'effet anti inflammatoire des AL restent ainsi partiellement élucidés.

Au cours de nos travaux, l'administration systémique d'AL au décours d'une laparotomie ou d'une péritonite induite par la carragénine a permis de diminuer significativement les douleurs viscérale et pariétale en même temps qu'une diminution significative de la production des médiateurs de l'inflammation et de la stimulation du

SNC. Cet effet « anti inflammatoire » avait déjà été observé auparavant. En effet, Beloeil et al. ont montré que la production systémique de cytokines induite par une inflammation plantaire était inhibée par la bupivacaïne administrée par voie systémique ou par un bloc nerveux (Beloeil, Ababneh et al. 2006).

Les mécanismes impliqués dans l'effet anti inflammatoire des AL administrés par voie systémique ou par un bloc nerveux sont différents : (1) des phénomènes locaux passant par le blocage des canaux sodiques d'une part, et (2) des phénomènes systémiques passant par un effet sur d'autres cibles cellulaires sont impliqués.

5. Comparaison entre ALR et AL systémique

Dans l'étude 1, la dose cumulative de la ropivacaïne par voie intraveineuse entraînant une crise convulsive est de $13,2 \pm 3$ mg/kg chez le rat, elle correspond à une concentration plasmatique de $10,3 \pm 1,4$ µg/ml (Ohmura, Kawada et al. 2001). Cette même concentration plasmatique provoque une diminution de 25 % de la pression artérielle chez le rat (Dony, Dewinde et al. 2000). Nous avons choisi la dose de 15 mg/kg/24h par voie intramusculaire afin d'obtenir une efficacité maximale tout en évitant les effets secondaires qui peuvent apparaître à des doses supérieures. Pour la comparaison de l'effet systémique et pré péritonéal, la même dose a été utilisée par voie pré-péritonéale (15 mg/kg/24h) pour le groupe Ropi 2 et une dose plus importante (90 mg/kg/24h) pour le groupe Ropi 7,5.

Le dosage de la concentration sanguine de la ropivacaïne dans les différents groupes montre des valeurs très inférieures aux concentrations toxiques. Les résultats que nous avons obtenus montrent que l'effet analgésique de la ropivacaïne est comparable avec cependant des doses 6 fois plus importantes pour la voie pré péritonéale par rapport à l'administration systémique.

Par ailleurs, nous n'avons pas retrouvé d'effet anti inflammatoire significatif dans le groupe infiltration pré péritonéale malgré les fortes doses administrées.

La mise en place du cathéter d'infiltration étant plus délicate et plus coûteuse que

l'administration systémique, il est nécessaire de confirmer nos résultats expérimentaux par des études cliniques afin de bien définir la place des cathéters d'infiltration en chirurgie abdominale. Par ailleurs, aucune étude clinique n'a évalué l'efficacité et la sécurité de la ropivacaïne à fortes doses par voie pré péritonéale. Cependant, l'administration systémique d'AL s'accompagne naturellement de concentrations plasmatiques plus élevées associées à un certain nombre d'effets secondaires quasiment absents par voie pré péritonéale. Le choix entre ces deux techniques reste donc à évaluer.

6. Intérêt du bloc de la paroi abdominale chez le rat

Dans l'étude 2, nous avons proposé et validé un bloc de la paroi abdominale chez le rat. La validation de ce bloc est primordiale car c'est le premier modèle de bloc de la paroi abdominale décrit chez l'animal en général et le rat en particulier.

Ce bloc permet l'étude du mode d'action des blocs de la paroi abdominale dans la prise en charge de la douleur aiguë post opératoire et dans la chronicisation de la douleur.

Après dissection des rats et visualisation de l'innervation de leur paroi abdominale, nous avons proposé un bloc en multi sites d'injection. Etant donné que l'identification de l'espace paravertébral chez le rat est difficile par voie transcutanée et que l'injection entre l'oblique interne et le muscle transverse pour la réalisation d'un TAP bloc est impossible en raison de la faible épaisseur des muscles de la paroi abdominale du rat, nous avons proposé un bloc qui ressemble à un bloc intercostal au niveau thoracique et à un bloc paravertébral au niveau abdominal. Devant la possibilité d'avoir une diffusion des AL dans l'espace péri-dural, en intra thoracique et ou en intra péritonéale, nous avons choisi d'injecter un petit volume d'AL par site d'injection tout en respectant les doses toxiques.

Les résultats de l'étude 2 montrent que le bloc proposé diminue de façon significative la douleur provoquée par application des filaments de von Frey sur la paroi abdominale après une inflammation pariétale induite par la carragénine. La

diminution de l'expression de c-Fos au niveau médullaire touche les métamères allant de T5 à L3 ce qui correspond à la projection médullaire de la paroi abdominale chez le rat.

L'ensemble de ces résultats montre que le bloc de la paroi abdominale que nous proposons est efficace et valide. En effet, la paroi abdominale du rat est comparable à celle de l'être humain ce qui signifie que l'étude des mécanismes d'action des AL par le bloc de la paroi abdominale proposé chez le rat pourrait permettre, par extrapolation, de comprendre les mécanismes d'action des AL utilisés dans les blocs de la paroi chez l'homme (Rizk 1980; Brown, Banuelos et al. 2010).

En effet, nos résultats confirment l'efficacité des deux techniques d'ALR utilisées actuellement en pratique clinique dans le traitement de la douleur en chirurgie viscérale (cathéters pré péritonéaux et blocs de la paroi abdominale).

Alors que les cathéters d'infiltration ressemblent plutôt à des infiltrations cicatricielles dans un modèle de douleur périphérique, les blocs de la paroi abdominale ressemblent plutôt à un bloc péri nerveux.

Les mécanismes d'action des AL engagés dans ces 2 modèles sont probablement multiples et différents et restent donc à explorer.

Nous avons pu démontrer qu'un bloc de la paroi abdominale était suffisant pour diminuer la transmission de la nociception vers le SNC (moelle épinière et tractus du noyau solitaire) aussi bien dans le cas d'une inflammation pariétale que d'une inflammation péritonéale. Ces résultats sont conformes avec notre hypothèse initiale que les afférences nerveuses pariétales jouent un rôle important dans la transmission de la nociception viscérale. Ils sont également en accord avec les études qui montrent chez l'homme que le TAP bloc est efficace dans la chirurgie coelioscopique (Saliminia, Azimaraghi et al. 2015). L'effet des AL par voie systémique montre la même efficacité dans l'inhibition de la transmission de la nociception vers le SNC. Cet effet laisse penser qu'une faible concentration systémique des AL est suffisante pour diminuer la transmission de la nociception lors d'une péritonite inflammatoire et que l'action locale est due en partie à l'absorption systémique des AL.

Au cours de l'étude 2 nous avons provoqué une inflammation bilatérale ainsi qu'un bloc bilatéral de la paroi abdominale. Il est donc difficile d'exclure complètement un effet systémique des AL administrés par le bloc de la paroi abdominale que nous avons décrit dans cette étude.

7. Comparaison entre le bloc de la paroi abdominale et la vagotomie

Les résultats de l'étude 3 ont permis de comparer l'effet des AL à celle d'une vagotomie unilatérale dans la transmission de la douleur viscérale aiguë vers le SNC.

En effet, la vagotomie chimique préventive réalisée 2 jours avant l'induction de la péritonite conduit à une diminution statistiquement significative du nombre de noyaux exprimant c-Fos par rapport à une péritonite sans vagotomie au niveau tronculaire.

Cette diminution du nombre des noyaux c-Fos observée confirme les résultats observés par Wan et al. après injection intra péritonéale de LPS (Wan, Janz et al. 1993). Par contre, le modèle de péritonite utilisé par Wan et al. est un modèle de péritonite infectieuse alors que le modèle que nous avons utilisé est un modèle de péritonite aseptique qui ressemble donc plus à une péritonite post chirurgicale.

La diminution de l'expression tronculaire de c-Fos observée dans le groupe ayant subi une vagotomie droite est bilatérale et symétrique. Plusieurs explications sont possibles : (1) il existe chez le rat des connections intra thoraciques entre les 2 nerfs vagues droit et gauche allant de 9 à 30% des fibres nerveuses ce qui explique qu'une vagotomie ne peut pas être complète (Sauter, Niiijima et al. 1983; Horn and Friedman 2005). (2) Une stimulation électrique cervicale du nerf vague gauche provoque une expression tronculaire bilatérale et plus ou moins symétrique de c-Fos (Gil, Bugajski et al. 2009; Chen and Williams 2012). (3) Les nerfs spinaux stimulés par la péritonite se projettent au niveau du tronc cérébral de façon bilatérale et provoquent l'expression bilatérale de c-Fos ce qui compenserait l'effet de la vagotomie.

Il a été largement démontré que le nerf vague joue un rôle anti inflammatoire dans les modèles de sepsis induits par injection intrapéritonéale ou intraveineuse de LPS ou

d'IL-1 β (Watkins, Wiertelak et al. 1994b; Mihaylova, Killian et al. 2012). Le nerf vague est également connu pour être plus impliqué dans la douleur affective sensorielle que dans la douleur sensitive et discriminative. Cependant, son rôle dans la douleur aiguë n'est pas complètement élucidé et les résultats sont discordants en fonction du modèle utilisé. Alors que la vagotomie chirurgicale sous diaphragmatique est proposée dans le traitement de certains types de douleur cancéreuse intense et donc dans un modèle de douleur chronique, elle diminue l'hyperalgésie liée à une stimulation périphérique suite à une péritonite septique mais induit, par contre, une hyperalgésie par dilatation colorectale (Ajao 1977; Watkins, Wiertelak et al. 1994a; Chen, Wu et al. 2008). La même équipe de Chen et al. a montré qu'une stimulation électrique du nerf vague de faible intensité entraînait une diminution de la douleur viscérale par distension colorectale (Chen, Wu et al. 2008). Ces résultats montrent que le nerf vague joue certainement un rôle dans la transmission et la modulation de la douleur viscérale mais surtout un rôle dans la transmission de la nociception de la cavité abdominale vers le SNC.

D'autre part, Le nerf vague joue un rôle dans la transmission des cytokines de la cavité abdominale vers le SNC. Cependant, une vagotomie sous diaphragmatique ne provoque pas une diminution des concentrations plasmatiques de cytokines sanguines ou hépatiques après une péritonite septique induite par du LPS même si cette vagotomie diminue la stimulation de c-Fos au niveau des noyaux paraventriculaires (Wan, Janz et al. 1993; Hansen, Daniels et al. 2000). Ces résultats laissent comprendre que l'effet de la vagotomie sur la stimulation de c-Fos après une péritonite non compliquée passe surtout par la voie de la transmission axonale et non pas par une voie systémique.

Une destruction unilatérale du noyau solitaire gauche chez le rat entraîne une diminution de l'hyperalgésie périphérique induite par une péritonite au LPS (Wiertelak, Roemer et al. 1997).

Dans notre modèle expérimental, nous avons opté pour une vagotomie cervicale chimique unilatérale pour (1) éviter de faire subir aux animaux un stress chirurgical supplémentaire par vagotomie sous diaphragmatique et les conséquences qui en résultent et pour (2) éviter les conséquences cardiovasculaires d'une vagotomie cervicale bilatérale.

8. Comparaison entre les AL par voie systémique et la vagotomie

Les résultats de l'étude 3 montrent que les AL administrés par voie systémique entraînent une diminution de la transmission de la nociception vers le SNC d'une façon comparable à celle de la vagotomie.

Comme nous l'avons déjà signalé auparavant, les AL exercent une action directe sur les cellules du SNC aussi bien sur les neurones que sur les astrocytes ou la microglie et présentent un effet anti inflammatoire direct sur les cellules immunitaires de la cavité abdominale pouvant expliquer ce phénomène.

Les AL peuvent avoir un effet direct sur le nerf vague en diminuant la transmission axonale de ce nerf lors d'une stimulation péritonéale, cette troisième hypothèse n'a jamais été étudiée.

VI- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

1. Conclusion

Les travaux que nous avons réalisés montrent que lors d'une laparotomie, les AL sont efficaces dans le traitement de la nociception aussi bien par voie systémique que par voie locorégionale. Nous avons démontré qu'un bloc de la paroi abdominale, ainsi qu'une infiltration pré péritonéale diminuaient la transmission de la nociception viscérale vers le SNC par action directe sur les terminaisons nerveuses pariétales. Cependant, lors d'une laparotomie, l'administration systémique d'AL possède une efficacité dans l'inhibition de la transmission de la nociception viscérale vers le SNC associée à un effet anti inflammatoire local et systémique supérieur à celui d'une administration locorégionale.

En pratique, lors d'une péritonite d'intensité modérée, la douleur pariétale entraîne une impotence qui, associée à la douleur ressentie, est source de complications (décubitus, reprise tardive du transit intestinal liée à l'immobilité). Le simple fait de supprimer cette douleur est bénéfique. Par contre, les afférences viscérales ne sont pas toutes inhibées par le blocage des afférences médullaires comme le montrent les études anatomiques anciennes (Gomez-Amaya, Barbe et al. ; Kalmari, Niissalo et al. 2001; Sikandar and Dickenson 2012). Ainsi les AL par leur action systémique anti inflammatoire, par le blocage du transport axonal, en particulier des cytokines pro inflammatoires sécrétées en périphérie, ont une action complémentaire. Les structures supérieures, comme le noyau du tractus solitaire sont sensibles à cette action systémique des AL puisque ceux-ci, injectés par voie systémique, ont une action inhibitrice sur le marquage c-Fos au même titre que la vagotomie chimique.

2. Suite à envisager et perspectives

Les travaux que nous avons menés montrent plusieurs points qui méritent d'être plus approfondis :

- dans l'étude 2, il est important d'étudier l'effet d'un bloc péri nerveux unilatéral sur une inflammation unilatérale de la paroi abdominale afin de pouvoir confirmer une

action locale exclusive des AL dans le bloc que nous avons décrit et d'écartier définitivement le doute sur un effet systémique des AL.

- Dans l'étude 3 il est indispensable d'étudier le profil des marqueurs de l'inflammation (TNF- α ou IL-1 β) au niveau de la moelle épinière et du noyau solitaire pour avoir plus d'explications sur l'effet de la vagotomie, des AL par voie systémique ou encore des AL par bloc de la paroi abdominale. Cette exploration nous permettra de distinguer un effet anti inflammatoire des AL d'un effet direct sur la transmission axonale du nerf vague ou un effet direct sur les cellules du SNC.

Il est intéressant d'étudier dans le même contexte de l'étude 3 l'effet des AL et de la vagotomie sur l'inflammation péritonéale et systémique, notamment l'effet sur l'activité des macrophages hépatiques qui sont fortement impliqués dans l'activation du nerf vague.

Il est indispensable également d'étudier l'hyperalgésie par distension colorectale induite par une péritonite chez des rats ayant subi une vagotomie selon notre modèle expérimental . Dans ce cas, l'effet des AL sur l'hyperalgésie induite est intéressant à explorer.

- Malgré les progrès observés depuis quelques années concernant les mécanismes d'action des AL selon les différentes voies d'administration, il reste un long travail à faire afin de comprendre tous les mécanismes d'action impliqués. Parmi ces pistes évoquées les MAP kinases semblent jouer un rôle primordial dans la compréhension des mécanismes d'action des AL surtout la voie de signalisation Scr ou la voie du p38. En effet, p38 est largement étudié dans les pathologies viscérales et dans la douleur périphérique (Noguchi, Kondo et al. 2012; Dai, Zong et al. 2014). L'action des AL sur la voie Scr et les TLR-4 est surtout connue dans des modèles infectieux mais n'a jamais été étudiée dans un modèle d'inflammation chirurgicale (Piegeler, Dull et al. 2014). Les AL auraient-ils des mécanismes d'action différents selon l'origine de la stimulation inflammatoire ? Quelle est la voie intracellulaire dominante et indispensable pour l'activité des AL et quelles sont les voies accessoires? Et finalement, est-ce que cette voie dominante change en fonction du type d'inflammation induite?

- Nous souhaitons étudier la séquence des phénomènes d'activation cellulaire

impliquée dans la douleur viscérale aiguë et sa chronicisation. La séquence de stimulation des neurones, de la microglie ou des astrocytes dans la douleur aiguë et chronique a déjà été explorée dans la littérature et constitue un point important dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la chronicisation de la douleur et les thérapeutiques envisageables (Ji, Kawasaki et al. 2006; Liu, Lu et al. 2012; Lu 2014). Ainsi, une douleur aiguë est toujours due à une activation neuronale puis microgliale et astrocytaire alors qu'une douleur chronique est due à une suractivation et à un « non retour » à l'état de base de la microglie et des astrocytes. Un modèle de chronicisation de la douleur abdominale peut être provoqué par une stimulation aiguë répétitive (comme des injections répétitives de carragénine dans la cavité abdominale) qui ressemble à un modèle de douleur chronique périphérique déjà utilisé dans la littérature (Rivat, Laulin et al. 2002). L'exploration des mécanismes cellulaires impliqués dans la chronicisation de la douleur viscérale est donc possible ainsi que l'effet des AL dans la prévention ou le traitement de cette douleur chronique.

- Il est largement démontré dans la littérature que l'utilisation des AL dans la chirurgie abdominale améliore la reprise du transit intestinal post opératoire. Cette amélioration est attribuée à une action directe des AL sur les muscles lisses du tube digestif ou à une diminution du tonus du SNS. Les AL peuvent agir directement sur le système nerveux entérique intégré dans la paroi du tube digestif ou directement sur les cellules musculaires lisses ou sur les deux à la fois. Cette piste est à explorer pour une meilleure compréhension de l'effet des AL dans la douleur et la réhabilitation post opératoire d'une chirurgie abdominale.

- Il est indispensable de comparer les effets des AL par voie IM avec un pic plasmatique efficace supposé à une administration IV avec une concentration plasmatique plutôt stable et constante. La voie IM utilisée lors de nos études ressemble plus à une administration IP des AL plutôt qu'à une administration IV. L'efficacité de l'administration IP des AL en chirurgie laparoscopique est connue (Labaille, Mazoit et al. 2002; Rivard, Vogel et al. 2015). Une étude récente a même démontré que lors d'une chirurgie coelioscopique, l'administration IP des AL est plus efficace que leur administration IV (Perniola, Magnuson et al. 2014). Cette efficacité peut être due à un effet local ou à une absorption systémique associée à un pic plasmatique comparable à l'administration IM des AL. Il est également intéressant de comparer la voie IP à la

voie IM dans notre modèle expérimental.

Nos travaux permettent de proposer un début d'explication concernant l'effet des AL en chirurgie abdominale. Nous avons utilisé la bupivacaïne avec une forme galénique retard car l'effet des AL en général est très court chez le rongeur. Un effet « classe » a été présumé.

Une meilleure compréhension des voies de la douleur viscérale devrait conduire à une attitude thérapeutique plus ciblée permettant une meilleure prise en charge de la douleur post laparotomie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ajao, O. G. (1977). "Vagotomy for relief of pain in some upper gastrointestinal neoplasms." J Natl Med Assoc **69**(9): 655-8.
- Al-Chaer, E. D., M. Kawasaki, et al. (2000). "A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development." Gastroenterology **119**(5): 1276-85.
- Altschuler, S. M., X. M. Bao, et al. (1989). "Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the rat: sensory ganglia and nuclei of the solitary and spinal trigeminal tracts." J Comp Neurol **283**(2): 248-68.
- Ammons, W. S., R. W. Blair, et al. (1983). "Vagal afferent inhibition of primate thoracic spinothalamic neurons." J Neurophysiol **50**(4): 926-40.
- Andersson, U. and K. J. Tracey (2012). "Reflex principles of immunological homeostasis." Annu Rev Immunol **30**: 313-35.
- Baaj, J. M., R. A. Alsatli, et al. (2006). "Efficacy of ultrasound-guided transversus abdominis plane (TAP) block for postcesarean section delivery analgesia--a double-blind, placebo-controlled, randomized study." Middle East J Anaesthesiol **20**(6): 821-6.
- Beaussier, M., H. El'Ayoubi, et al. (2007). "Continuous preperitoneal infusion of ropivacaine provides effective analgesia and accelerates recovery after colorectal surgery: a randomized, double-blind, placebo-controlled study." anesthesiology **107**(3): 461-8.
- Beloel, H., Z. Ababneh, et al. (2006). "Effects of bupivacaine and tetrodotoxin on carrageenan-induced hind paw inflammation in rats (Part 1): hyperalgesia, edema, and systemic cytokines." anesthesiology **105**(1): 128-38.
- Berthoud, H. R., T. Earle, et al. (2001). "Food-related gastrointestinal signals activate caudal brainstem neurons expressing both NMDA and AMPA receptors." Brain Res **915**(2): 143-54.
- Berthoud, H. R. and W. L. Neuhuber (2000). "Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system." Auton Neurosci **85**(1-3): 1-17.
- Berthoud, H. R. and L. M. Patterson (1996). "Innervation of rat abdominal paraganglia by calcitonin-like immunoreactive nerve fibers." Neurosci Lett **210**(2): 115-8.
- Berthoud, H. R., L. M. Patterson, et al. (1997). "Distribution and structure of vagal afferent intraganglionic laminar endings (IGLEs) in the rat gastrointestinal tract." Anat Embryol (Berl) **195**(2): 183-91.
- Berthoud, H. R. and T. L. Powley (1992). "Vagal afferent innervation of the rat fundic stomach: morphological characterization of the gastric tension receptor." J Comp Neurol **319**(2): 261-76.
- Berthoud, H. R. and T. L. Powley (1993). "Characterization of vagal innervation to the rat celiac, suprarenal and mesenteric ganglia." J Auton Nerv Syst **42**(2): 153-69.
- Bharti, N., P. Kumar, et al. (2011). "The efficacy of a novel approach to transversus abdominis plane block for postoperative analgesia after colorectal surgery." Anesth Analg **112**(6): 1504-8.
- Bianchi, M. E. (2007). "DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger." J Leukoc Biol **81**(1): 1-5.
- Biber, B. and J. Fara (1973). "Intestinal motility increased by tetrodotoxin, lidocaine, and procaine." Experientia **29**(5): 551-2.
- Bielefeldt, K. and B. M. Davis (2008). "Differential effects of ASIC3 and TRPV1 deletion on gastroesophageal sensation in mice." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **294**(1): G130-8.
- Bliss, T. V. and T. Lomo (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." J Physiol **232**(2): 331-56.
- Block, L., P. Jorneberg, et al. (2013). "Ultralow concentrations of bupivacaine exert anti-inflammatory effects on inflammation-reactive astrocytes." Eur J Neurosci **38**(11): 3669-78.
- Blumenthal, S., A. Borgeat, et al. (2006). "Ropivacaine decreases inflammation in experimental endotoxin-induced lung injury." anesthesiology **104**(5): 961-9.
- Boeckstaens GE, d. J. W. (2009). "Neuroimmune mechanisms in postoperative ileus." Gut Sep; **58**(9): 1300-11.
- Bortoff, A. and R. Muller (1975). "Stimulation of intestinal smooth muscle by atropine, procaine, and tetrodotoxin." Am J Physiol **229**(6): 1609-13.
- Brierley, S. M., A. J. Page, et al. (2008). "Selective role for TRPV4 ion channels in visceral sensory pathways." Gastroenterology **134**(7): 2059-69.

- Brown, S. H., K. Banuelos, et al. (2010). "Architectural and morphological assessment of rat abdominal wall muscles: comparison for use as a human model." *J Anat* **217**(3): 196-202.
- Buijs, R. M., J. van der Vliet, et al. (2008). "Spleen vagal denervation inhibits the production of antibodies to circulating antigens." *PLoS One* **3**(9): e3152.
- Cailhier, J. F., D. A. Sawatzky, et al. (2006). "Resident pleural macrophages are key orchestrators of neutrophil recruitment in pleural inflammation." *Am J Respir Crit Care Med* **173**(5): 540-7.
- Cameron, D. M., T. J. Brennan, et al. (2008). "Hind paw incision in the rat produces long-lasting colon hypersensitivity." *J Pain* **9**(3): 246-53.
- Castelucci, P., H. L. Robbins, et al. (2003). "P2X(2) purine receptor immunoreactivity of intraganglionic laminar endings in the mouse gastrointestinal tract." *Cell Tissue Res* **312**(2): 167-74.
- Castro, G. A. and C. J. Arntzen (1993). "Immunophysiology of the gut: a research frontier for integrative studies of the common mucosal immune system." *Am J Physiol* **265**(4 Pt 1): G599-610.
- Chacur, M., D. Lambertz, et al. (2009). "Role of spinal microglia in myositis-induced central sensitisation: an immunohistochemical and behavioural study in rats." *Eur J Pain* **13**(9): 915-23.
- Chandler, M. J., J. Zhang, et al. (1996). "Vagal, sympathetic and somatic sensory inputs to upper cervical (C1-C3) spinothalamic tract neurons in monkeys." *J Neurophysiol* **76**(4): 2555-67.
- Chen, C. C. and C. L. Williams (2012). "Interactions between epinephrine, ascending vagal fibers, and central noradrenergic systems in modulating memory for emotionally arousing events." *Front Behav Neurosci* **6**: 35.
- Chen, S. L., X. Y. Wu, et al. (2008). "Subdiaphragmatic vagal afferent nerves modulate visceral pain." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**(6): G1441-9.
- Cheng, Z., T. L. Powley, et al. (1997). "A laser confocal microscopic study of vagal afferent innervation of rat aortic arch: chemoreceptors as well as baroreceptors." *J Auton Nerv Syst* **67**(1-2): 1-14.
- Chiu, I. M., C. A. von Hehn, et al. (2012). "Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology." *Nat Neurosci* **15**(8): 1063-7.
- Cockayne, D. A., P. M. Dunn, et al. (2005). "P2X2 knockout mice and P2X2/P2X3 double knockout mice reveal a role for the P2X2 receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP." *J Physiol* **567**(Pt 2): 621-39.
- Cockayne, D. A., S. G. Hamilton, et al. (2000). "Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice." *Nature* **407**(6807): 1011-5.
- Coderre, T. J., J. Katz, et al. (1993). "Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence." *Pain* **52**(3): 259-85.
- Coelho, A. M., V. Ossovskaya, et al. (2003). "Proteinase-activated receptor-2: physiological and pathophysiological roles." *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* **1**(1): 61-72.
- Collins, J. J., C. E. Lin, et al. (1999). "Vagal afferents from the uterus and cervix provide direct connections to the brainstem." *Cell Tissue Res* **295**(1): 43-54.
- Cook, A. J., C. J. Woolf, et al. (1987). "Dynamic receptive field plasticity in rat spinal cord dorsal horn following C-primary afferent input." *Nature* **325**(7000): 151-3.
- da Costa, J. C., P. C. Olsen, et al. (2007). "JMF2-1, a lidocaine derivative acting on airways spasm and lung allergic inflammation in rats." *J Allergy Clin Immunol* **119**(1): 219-25.
- da Matta, C. B., E. T. de Souza, et al. (2011). "Antinociceptive and anti-inflammatory activity from algae of the genus *Caulerpa*." *Mar Drugs* **9**(3): 307-18.
- Dadure, C., F. Motais, et al. (2005). "Continuous peripheral nerve blocks at home for treatment of recurrent complex regional pain syndrome I in children." *anesthesiology* **102**(2): 387-91.
- Dai, J. N., Y. Zong, et al. (2014). "Gastrodin inhibits expression of inducible NO synthase, cyclooxygenase-2 and proinflammatory cytokines in cultured LPS-stimulated microglia via MAPK pathways." *PLoS One* **6**(7): e21891.
- Daly, D., W. Rong, et al. (2007). "Bladder afferent sensitivity in wild-type and TRPV1 knockout mice." *J Physiol* **583**(Pt 2): 663-74.
- Damas, J., V. Bourdon, et al. (1990). "Kinins and peritoneal exudates induced by carrageenin and zymosan in rats." *Br J Pharmacol* **101**(2): 418-22.
- Dang, K., K. Bielfeldt, et al. (2005). "Gastric ulcers evoke hyperexcitability and enhance P2X receptor function in rat gastric sensory neurons." *J Neurophysiol* **93**(6): 3112-9.
- De Backer, O., E. Elinck, et al. (2009). "Water-soluble CO-releasing molecules reduce the development of postoperative ileus via modulation of MAPK/HO-1 signalling and reduction of oxidative stress." *Gut* **58**(3): 347-56.

- Deruddre, S., E. Combettes, et al. (2010). "Effects of a bupivacaine nerve block on the axonal transport of Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha) in a rat model of carrageenan-induced inflammation." *Brain Behav Immun* **24**(4): 652-9.
- Dickenson, A. H. and A. F. Sullivan (1987). "Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurones following C fibre stimulation." *Neuropharmacology* **26**(8): 1235-8.
- Dickstein, R. A., L. Kiremidjian-Schumacher, et al. (1984). "Effect of lidocaine on production of migration inhibitory factor and on macrophage motility: in vitro exposure of guinea pig lymphocytes and macrophages." *J Leukoc Biol* **36**(5): 621-32.
- Dony, P., V. Dewinde, et al. (2000). "The comparative toxicity of ropivacaine and bupivacaine at equipotent doses in rats." *Anesth Analg* **91**(6): 1489-92.
- Dragusin, M., S. Wehner, et al. (2006). "Effects of sphingosine-1-phosphate and ceramide-1-phosphate on rat intestinal smooth muscle cells: implications for postoperative ileus." *FASEB J* **20**(11): 1930-2.
- Duarte, A. M., E. Pospisilova, et al. (2005). "Reduction of postincisional allodynia by subcutaneous bupivacaine: findings with a new model in the hairy skin of the rat." *anesthesiology* **103**(1): 113-25.
- Estebe, J. P., M. E. Gentili, et al. (2004). "Contralateral effect of amitriptyline and bupivacaine for sciatic nerve block in an animal model of inflammation." *Br J Anaesth* **93**(5): 705-9.
- Euchner-Wamser, I., J. N. Sengupta, et al. (1993). "Characterization of responses of T2-T4 spinal cord neurons to esophageal distension in the rat." *J Neurophysiol* **69**(3): 868-83.
- Felten, D. L., S. Y. Felten, et al. (1985). "Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue." *J Immunol* **135**(2 Suppl): 755s-765s.
- Fletcher, D., V. Kayser, et al. (1996). "Influence of timing of administration on the analgesic effect of bupivacaine infiltration in carrageenin-injected rats." *anesthesiology* **84**(5): 1129-37.
- Forssmann, W. G. and S. Ito (1977). "Hepatocyte innervation in primates." *J Cell Biol* **74**(1): 299-313.
- Furness, J. B., W. A. Kunze, et al. (1999). "Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. II. The intestine as a sensory organ: neural, endocrine, and immune responses." *Am J Physiol* **277**(5 Pt 1): G922-8.
- Furukawa, N., M. Hatano, et al. (2001). "Glutamatergic vagal afferents may mediate both retching and gastric adaptive relaxation in dogs." *Auton Neurosci* **93**(1-2): 21-30.
- Gao, Y. J., L. Zhang, et al. (2009). "JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain." *J Neurosci* **29**(13): 4096-108.
- Gebhart, G. F. (2000). "Visceral pain-peripheral sensitisation." *Gut* **47 Suppl 4**: iv54-5; discussion iv58.
- Geerling, J. C., J. W. Shin, et al. (2010). "Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem." *J Comp Neurol* **518**(9): 1460-99.
- Gentili, M. E., J. X. Mazoit, et al. (1999). "The effect of a sciatic nerve block on the development of inflammation in carrageenan injected rats." *Anesth Analg* **89**(4): 979-84.
- Gil, K., A. Bugajski, et al. (2009). "Physiological and morphological effects of long-term vagal stimulation in diet induced obesity in rats." *J Physiol Pharmacol* **60 Suppl 3**: 61-6.
- Goehler, L. E., R. P. Gaykema, et al. (2000). "Vagal immune-to-brain communication: a visceral chemosensory pathway." *Auton Neurosci* **85**(1-3): 49-59.
- Gomez-Amaya, S. M., M. F. Barbe, et al. "Bladder reinnervation using a primarily motor donor nerve (femoral nerve branches) is functionally superior to using a primarily sensory donor nerve (genitofemoral nerve)." *J Urol* **193**(3): 1042-51.
- Groudine, S. B., H. A. Fisher, et al. (1998). "Intravenous lidocaine speeds the return of bowel function, decreases postoperative pain, and shortens hospital stay in patients undergoing radical retropubic prostatectomy." *Anesth Analg* **86**(2): 235-9.
- Grundy, D. (2002). "Neuroanatomy of visceral nociception: vagal and splanchnic afferent." *Gut* **51 Suppl 1**: i2-5.
- Guirimand, F. and D. Le Bars (1996). "[Physiology of nociception]." *Ann Fr Anesth Reanim* **15**(7): 1048-79.
- Guz, A. (1977). "Respiratory sensations in man." *Br Med Bull* **33**(2): 175-7.
- Hansen, M. K., S. Daniels, et al. (2000). "Subdiaphragmatic vagotomy does not block intraperitoneal lipopolysaccharide-induced fever." *Auton Neurosci* **85**(1-3): 83-7.
- Hathway, G. J., D. Vega-Avelaira, et al. (2009). "Brief, low frequency stimulation of rat peripheral C-fibres evokes prolonged microglial-induced central sensitization in adults but not in neonates." *Pain* **144**(1-2): 110-8.

- Herroeder, S., S. Pecher, et al. (2007). "Systemic lidocaine shortens length of hospital stay after colorectal surgery: a double-blinded, randomized, placebo-controlled trial." *Ann Surg* **246**(2): 192-200.
- Hicks, G. A., J. R. Coldwell, et al. (2002). "Excitation of rat colonic afferent fibres by 5-HT(3) receptors." *J Physiol* **544**(Pt 3): 861-9.
- Hillsley, K. and D. Grundy (1998). "Serotonin and cholecystokinin activate different populations of rat mesenteric vagal afferents." *Neurosci Lett* **255**(2): 63-6.
- Hollmann, M. W. and M. E. Durieux (2000). "Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication?" *anesthesiology* **93**(3): 858-75.
- Hollmann, M. W., S. Herroeder, et al. (2004). "Time-dependent inhibition of G protein-coupled receptor signaling by local anesthetics." *anesthesiology* **100**(4): 852-60.
- Horn, C. C. and M. I. Friedman (2005). "Thoracic cross-over pathways of the rat vagal trunks." *Brain Res* **1060**(1-2): 153-61.
- Hummel, T., J. N. Sengupta, et al. (1997). "Responses of T2-4 spinal cord neurons to irritation of the lower airways in the rat." *Am J Physiol* **273**(3 Pt 2): R1147-57.
- Huston, J. M., M. Gallowitsch-Puerta, et al. (2007). "Transcutaneous vagus nerve stimulation reduces serum high mobility group box 1 levels and improves survival in murine sepsis." *Crit Care Med* **35**(12): 2762-8.
- Ikeda, H., J. Stark, et al. (2006). "Synaptic amplifier of inflammatory pain in the spinal dorsal horn." *Science* **312**(5780): 1659-62.
- Iwai, M., T. Miyashita, et al. (1991). "Inhibition of glucose production during hepatic nerve stimulation in regenerating rat liver perfused in situ. Possible involvement of gap junctions in the action of sympathetic nerves." *Eur J Biochem* **200**(1): 69-74.
- Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (1998). "Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response." *Semin Immunol* **10**(5): 349-50.
- Jesch, N. K., J. F. Kuebler, et al. (2006). "Laparoscopy vs minilaparotomy and full laparotomy preserves circulatory but not peritoneal and pulmonary immune responses." *J Pediatr Surg* **41**(6): 1085-92.
- Ji, R. R., Y. Kawasaki, et al. (2006). "Possible role of spinal astrocytes in maintaining chronic pain sensitization: review of current evidence with focus on bFGF/JNK pathway." *Neuron Glia Biol* **2**(4): 259-69.
- Jin, Y. H., T. W. Bailey, et al. (2004). "Purinergeric and vanilloid receptor activation releases glutamate from separate cranial afferent terminals in nucleus tractus solitarius." *J Neurosci* **24**(20): 4709-17.
- Kaba, A., S. R. Laurent, et al. (2007). "Intravenous lidocaine infusion facilitates acute rehabilitation after laparoscopic colectomy." *anesthesiology* **106**(1): 11-8; discussion 5-6.
- Kalmari, J., S. Niissalo, et al. (2001). "Modulation of visceral nociceptive responses of rat spinal dorsal horn neurons by sympathectomy." *Neuroreport* **12**(4): 797-801.
- Kayssi, A., S. Amadesi, et al. (2007). "Mechanisms of protease-activated receptor 2-evoked hyperexcitability of nociceptive neurons innervating the mouse colon." *J Physiol* **580**(Pt.3): 977-91.
- Keating, C., M. Beyak, et al. (2008). "Afferent hypersensitivity in a mouse model of post-inflammatory gut dysfunction: role of altered serotonin metabolism." *J Physiol* **586**(Pt 18): 4517-30.
- Khasar, S. G., J. P. Miao, et al. (1998). "Modulation of bradykinin-induced mechanical hyperalgesia in the rat by activity in abdominal vagal afferents." *Eur J Neurosci* **10**(2): 435-44.
- King, D. E., R. J. Macleod, et al. (2009). "Trinitrobenzenesulphonic acid colitis alters Na 1.8 channel expression in mouse dorsal root ganglia neurons." *Neurogastroenterol Motil* **21**(8): 880-e64.
- Kirkup, A. J., C. E. Booth, et al. (1999). "Excitatory effect of P2X receptor activation on mesenteric afferent nerves in the anaesthetised rat." *J Physiol* **520 Pt 2**: 551-63.
- Kirkup, A. J., W. Jiang, et al. (2003). "Stimulation of proteinase-activated receptor 2 excites jejunal afferent nerves in anaesthetised rats." *J Physiol* **552**(Pt 2): 589-601.
- Koppert, W., N. Ostermeier, et al. (2000). "Low-dose lidocaine reduces secondary hyperalgesia by a central mode of action." *Pain* **85**(1-2): 217-24.
- Koppert, W., M. Weigand, et al. (2004). "Perioperative intravenous lidocaine has preventive effects on postoperative pain and morphine consumption after major abdominal surgery." *Anesth Analg* **98**(4): 1050-5, table of contents.
- Koppert, W., S. Zeck, et al. (1998). "Low-dose lidocaine suppresses experimentally induced hyperalgesia in humans." *anesthesiology* **89**(6): 1345-53.
- Kumazawa, T. (1990). "Functions of the nociceptive primary neurons." *Jpn J Physiol* **40**(1): 1-14.

- Kunze, W. A. and J. B. Furness (1999). "The enteric nervous system and regulation of intestinal motility." *Annu Rev Physiol* **61**: 117-42.
- Kuo, C. P., S. W. Jao, et al. (2006). "Comparison of the effects of thoracic epidural analgesia and i.v. infusion with lidocaine on cytokine response, postoperative pain and bowel function in patients undergoing colonic surgery." *Br J Anaesth* **97**(5): 640-6.
- Labaille, T., J. X. Mazoit, et al. (2002). "The clinical efficacy and pharmacokinetics of intraperitoneal ropivacaine for laparoscopic cholecystectomy." *Anesth Analg* **94**(1): 100-5, table of contents.
- Lamb, K., F. Zhong, et al. (2006). "Experimental colitis in mice and sensitization of converging visceral and somatic afferent pathways." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**(3): G451-7.
- Lanteri-Minet, M., P. Isnardon, et al. (1993). "Spinal and hindbrain structures involved in visceroreception and visceronociception as revealed by the expression of Fos, Jun and Krox-24 proteins." *Neuroscience* **55**(3): 737-53.
- Latremoliere, A. and C. J. Woolf (2009). "Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity." *J Pain* **10**(9): 895-926.
- Lawrence, A. J. and B. Jarrott (1994). "L-glutamate as a neurotransmitter at baroreceptor afferents: evidence from in vivo microdialysis." *Neuroscience* **58**(3): 585-91.
- Le Bars, D., L. Villanueva, et al. (1992). "Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) in animals and in man." *Patol Fiziol Eksp Ter*(4): 55-65.
- Leduc, C., M. E. Gentili, et al. (2002). "The effect of local anesthetics and amitriptyline on peroxidation in vivo in an inflammatory rat model: preliminary reports." *Anesth Analg* **95**(4): 992-6, table of contents.
- Li, C. S. and D. V. Smith (1997). "Glutamate receptor antagonists block gustatory afferent input to the nucleus of the solitary tract." *J Neurophysiol* **77**(3): 1514-25.
- Liu, P. Y., C. L. Lu, et al. (2012). "Spinal microglia initiate and maintain hyperalgesia in a rat model of chronic pancreatitis." *Gastroenterology* **142**(1): 165-173 e2.
- Liu, T., Z. Z. Xu, et al. (2010). "Toll-like receptor 7 mediates pruritus." *Nat Neurosci* **13**(12): 1460-2.
- Lu, C. L. (2014). "Spinal microglia: A potential target in the treatment of chronic visceral pain." *J Chin Med Assoc* **77**(1): 3-9.
- Marret, E., M. Rolin, et al. (2008). "Meta-analysis of intravenous lidocaine and postoperative recovery after abdominal surgery." *Br J Surg* **95**(11): 1331-8.
- Matsumoto, S., S. Yoshida, et al. (2007). "Effect of 8-bromo-cAMP on the tetrodotoxin-resistant sodium (Nav 1.8) current in small-diameter nodose ganglion neurons." *Neuropharmacology* **52**(3): 904-24.
- McNeill, D. L., M. J. Chandler, et al. (1991). "Projection of nodose ganglion cells to the upper cervical spinal cord in the rat." *Brain Res Bull* **27**(2): 151-5.
- Melzack, R. (1971). "Phantom limb pain: implications for treatment of pathologic pain." *anesthesiology* **35**(4): 409-19.
- Melzack, R. and P. D. Wall (1965). "Pain mechanisms: a new theory." *Science* **150**(3699): 971-9.
- Menetrey, D., A. Gannon, et al. (1989). "Expression of c-fos protein in interneurons and projection neurons of the rat spinal cord in response to noxious somatic, articular, and visceral stimulation." *J Comp Neurol* **285**(2): 177-95.
- Metz, W. and W. G. Forssmann (1980). "Innervation of the liver in guinea pig and rat." *Anat Embryol (Berl)* **160**(3): 239-52.
- Miao, F. J., W. Janig, et al. (1994). "Role of vagal afferents and spinal pathways modulating inhibition of bradykinin-induced plasma extravasation by intrathecal nicotine." *J Neurophysiol* **72**(3): 1199-207.
- Miao, F. J., W. Janig, et al. (1997). "Inhibition of bradykinin-induced plasma extravasation produced by noxious cutaneous and visceral stimuli and its modulation by vagal activity." *J Neurophysiol* **78**(3): 1285-92.
- Middlekauff, H. R., S. A. Rivkees, et al. (1998). "Localization and functional effects of adenosine A1 receptors on cardiac vagal afferents in adult rats." *Am J Physiol* **274**(2 Pt 2): H441-7.
- Mihaylova, S., A. Killian, et al. (2012). "Effects of anti-inflammatory vagus nerve stimulation on the cerebral microcirculation in endotoxemic rats." *J Neuroinflammation* **9**: 183.
- Miranda, A., S. Peles, et al. (2004). "Altered visceral sensation in response to somatic pain in the rat." *Gastroenterology* **126**(4): 1082-9.
- Moore, K. A., T. Kohno, et al. (2002). "Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord." *J Neurosci* **22**(15): 6724-31.
- Morris, C. J. (2003). "Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse." *Methods Mol Biol* **225**: 115-21.

- Nance, D. M., D. A. Hopkins, et al. (1987). "Re-investigation of the innervation of the thymus gland in mice and rats." *Brain Behav Immun* **1**(2): 134-47.
- Nance, D. M. and V. M. Sanders (2007). "Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007)." *Brain Behav Immun* **21**(6): 736-45.
- Ness, T. J. (2000). "Intravenous lidocaine inhibits visceral nociceptive reflexes and spinal neurons in the rat." *anesthesiology* **92**(6): 1685-91.
- Ness, T. J. and G. F. Gebhart (1990). "Visceral pain: a review of experimental studies." *Pain* **41**(2): 167-234.
- Ness, T. J. and G. F. Gebhart (1991). "Interactions between visceral and cutaneous nociception in the rat. I. Noxious cutaneous stimuli inhibit visceral nociceptive neurons and reflexes." *J Neurophysiol* **66**(1): 20-8.
- Neuhuber, W. L. (1989). "Vagal afferent fibers almost exclusively innervate islets in the rat pancreas as demonstrated by anterograde tracing." *J Auton Nerv Syst* **29**(1): 13-8.
- Noguchi, N., Y. Kondo, et al. (2012). "Phosphorylation of epidermal growth factor receptor at serine 1047 by MAP kinase-activated protein kinase-2 in cultured lung epithelial cells treated with flagellin." *Arch Biochem Biophys* **529**(2): 75-85.
- Norgren, R. and G. P. Smith (1988). "Central distribution of subdiaphragmatic vagal branches in the rat." *J Comp Neurol* **273**(2): 207-23.
- Ohira, H., S. Fukuyama, et al. (2009). "Regulation of natural killer cell redistribution by prefrontal cortex during stochastic learning." *Neuroimage* **47**(3): 897-907.
- Ohmura, S., M. Kawada, et al. (2001). "Systemic toxicity and resuscitation in bupivacaine-, levobupivacaine-, or ropivacaine-infused rats." *Anesth Analg* **93**(3): 743-8.
- Pagano, R. L., M. A. Dias, et al. (2002). "Neutrophils and the calcium-binding protein MRP-14 mediate carrageenan-induced antinociception in mice." *Mediators Inflamm* **11**(4): 203-10.
- Peles, S., A. Miranda, et al. (2004). "Acute nociceptive somatic stimulus sensitizes neurones in the spinal cord to colonic distension in the rat." *J Physiol* **560**(Pt 1): 291-302.
- Perniola, A., A. Magnuson, et al. (2014). "Intraperitoneal local anesthetics have predominant local analgesic effect: a randomized, double-blind study." *anesthesiology* **121**(2): 352-61.
- Persson, S. and J. Broman (2004). "Glutamate, but not aspartate, is enriched in trigeminothalamic tract terminals and associated with their synaptic vesicles in the rat nucleus submedialis." *Exp Brain Res* **157**(2): 152-61.
- Pham-Marcou, T. A., H. Beloeil, et al. (2008). "Antinociceptive effect of resveratrol in carrageenan-evoked hyperalgesia in rats: prolonged effect related to COX-2 expression impairment." *Pain* **140**(2): 274-83.
- Pham-Marcou, T. A., M. Gentili, et al. (2005). "Effect of neurolytic nerve block on systemic carrageenan-induced inflammatory response in mice." *Br J Anaesth* **95**(2): 243-6.
- Phillips, R. J., E. A. Baronowsky, et al. (1997). "Afferent innervation of gastrointestinal tract smooth muscle by the hepatic branch of the vagus." *J Comp Neurol* **384**(2): 248-70.
- Piegeler, T., R. O. Dull, et al. (2014). "Ropivacaine attenuates endotoxin plus hyperinflation-mediated acute lung injury via inhibition of early-onset Src-dependent signaling." *BMC Anesthesiol* **14**: 57.
- Prechtel, J. C. and T. L. Powley (1990). "The fiber composition of the abdominal vagus of the rat." *Anat Embryol (Berl)* **181**(2): 101-15.
- Qi, J., K. Buzas, et al. (2011). "Painful pathways induced by TLR stimulation of dorsal root ganglion neurons." *J Immunol* **186**(11): 6417-26.
- Ra, Y. S., C. H. Kim, et al. (2010). "The analgesic effect of the ultrasound-guided transverse abdominis plane block after laparoscopic cholecystectomy." *Korean J Anesthesiol* **58**(4): 362-8.
- Randic, M., M. C. Jiang, et al. (1993). "Long-term potentiation and long-term depression of primary afferent neurotransmission in the rat spinal cord." *J Neurosci* **13**(12): 5228-41.
- Rivard, C., R. I. Vogel, et al. (2015). "Effect of Intraperitoneal Bupivacaine on Postoperative Pain in the Gynecologic Oncology Patient." *J Minim Invasive Gynecol*.
- Rivat, C., J. P. Laulin, et al. (2002). "Fentanyl enhancement of carrageenan-induced long-lasting hyperalgesia in rats: prevention by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist ketamine." *anesthesiology* **96**(2): 381-91.
- Rizk, N. N. (1980). "A new description of the anterior abdominal wall in man and mammals." *J Anat* **131**(Pt 3): 373-85.
- Rong, W., K. Hillsley, et al. (2004). "Jejunal afferent nerve sensitivity in wild-type and TRPV1 knockout mice." *J Physiol* **560**(Pt 3): 867-81.

- Rong, W., C. Keating, et al. (2009). "Purinergetic contribution to small intestinal afferent hypersensitivity in a murine model of postinfectious bowel disease." *Neurogastroenterol Motil* **21**(6): 665-71, e32.
- Rosas-Ballina, M., R. S. Goldstein, et al. (2009). "The selective alpha7 agonist GTS-21 attenuates cytokine production in human whole blood and human monocytes activated by ligands for TLR2, TLR3, TLR4, TLR9, and RAGE." *Mol Med* **15**(7-8): 195-202.
- Roughan, J. V. and P. A. Flecknell (2001). "Behavioural effects of laparotomy and analgesic effects of ketoprofen and carprofen in rats." *Pain* **90**(1-2): 65-74.
- Saliminia, A., O. Azimaraghi, et al. (2015). "Efficacy of transverse abdominis plane block in reduction of postoperation pain in laparoscopic cholecystectomy." *Acta Anaesthesiol Taiwan*.
- Sauter, J. F., A. Nijijima, et al. (1983). "Vagal neurons and pathways to the rat's lower viscera: an electrophysiological study." *Brain Res Bull* **11**(5): 487-91.
- Saxon, D. W. and D. A. Hopkins (1998). "Efferent and collateral organization of paratrigeminal nucleus projections: an anterograde and retrograde fluorescent tracer study in the rat." *J Comp Neurol* **402**(1): 93-110.
- Sengupta, J. N. and G. F. Gebhart (1994). "Characterization of mechanosensitive pelvic nerve afferent fibers innervating the colon of the rat." *J Neurophysiol* **71**(6): 2046-60.
- Serra, M. F., E. A. Anjos-Valotta, et al. (2012). "Nebulized lidocaine prevents airway inflammation, peribronchial fibrosis, and mucus production in a murine model of asthma." *anesthesiology* **117**(3): 580-91.
- Sikandar, S. and A. H. Dickenson (2012). "Visceral pain: the ins and outs, the ups and downs." *Curr Opin Support Palliat Care* **6**(1): 17-26.
- Sipe, W. E., S. M. Brierley, et al. (2008). "Transient receptor potential vanilloid 4 mediates protease activated receptor 2-induced sensitization of colonic afferent nerves and visceral hyperalgesia." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**(5): G1288-98.
- Sivilotti, L. and C. J. Woolf (1994). "The contribution of GABAA and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord." *J Neurophysiol* **72**(1): 169-79.
- Smith, G., I. Power, et al. (1999). "Acute pain--is there scientific evidence on which to base treatment?" *Br J Anaesth* **82**(6): 817-9.
- Sternberg, E. M. (2006). "Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens." *Nat Rev Immunol* **6**(4): 318-28.
- Talman, W. T. and E. Colombari (1995). "Evolution of dose-related cardiovascular responses to L-glutamate microinjected into the nucleus tractus solitarii after removal of the nodose ganglion in rat." *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* **22**(1): S37-9.
- Tanaka, K., T. Matsugami, et al. (2002). "The origin of sensory innervation of the peritoneum in the rat." *Anat Embryol (Berl)* **205**(4): 307-13.
- Tappenbeck, K., S. Hoppe, et al. (2013). "Lidocaine and structure-related mexiletine induce similar contractility-enhancing effects in ischaemia-reperfusion injured equine intestinal smooth muscle in vitro." *Vet J* **196**(3): 461-6.
- Taves, S., T. Berta, et al. (2013). "Microglia and spinal cord synaptic plasticity in persistent pain." *Neural Plast* **2013**: 753656.
- Teeling, J. L., L. M. Felton, et al. (2007). "Sub-pyrogenic systemic inflammation impacts on brain and behavior, independent of cytokines." *Brain Behav Immun* **21**(6): 836-50.
- Ter Horst, G. J. and F. Postema (1997). "Forebrain parasympathetic control of heart activity: retrograde transneuronal viral labeling in rats." *Am J Physiol* **273**(6 Pt 2): H2926-30.
- Thayer, J. F. and R. D. Lane (2009). "Claude Bernard and the heart-brain connection: further elaboration of a model of neurovisceral integration." *Neurosci Biobehav Rev* **33**(2): 81-8.
- Thayer, J. F. and E. M. Sternberg (2010). "Neural aspects of immunomodulation: focus on the vagus nerve." *Brain Behav Immun* **24**(8): 1223-8.
- Tiniakos, D. G., J. A. Lee, et al. (1996). "Innervation of the liver: morphology and function." *Liver* **16**(3): 151-60.
- Toda, S., A. Sakai, et al. (2011). "A local anesthetic, ropivacaine, suppresses activated microglia via a nerve growth factor-dependent mechanism and astrocytes via a nerve growth factor-independent mechanism in neuropathic pain." *Mol Pain* **7**: 2.
- Tracey, K. J. (2002). "The inflammatory reflex." *Nature* **420**(6917): 853-9.
- Traub, R. J., J. N. Sengupta, et al. (1996). "Differential c-fos expression in the nucleus of the solitary tract and spinal cord following noxious gastric distention in the rat." *Neuroscience* **74**(3): 873-84.

- Trotter, R. N., R. L. Stornetta, et al. (2007). "Transneuronal mapping of the CNS network controlling sympathetic outflow to the rat thymus." *Auton Neurosci* **131**(1-2): 9-20.
- Van Assche, G., G. Barbara, et al. (1999). "Neurotransmitters modulate cytokine-stimulated interleukin 6 secretion in rat intestinal smooth muscle cells." *Gastroenterology* **116**(2): 346-53.
- van der Zanden, E. P., F. W. Hilbers, et al. (2009). "Nicotinic acetylcholine receptor expression and susceptibility to cholinergic immunomodulation in human monocytes of smoking individuals." *Neuroimmunomodulation* **19**(4): 255-65.
- van Westerloo, D. J., I. A. Giebelen, et al. (2005). "The cholinergic anti-inflammatory pathway regulates the host response during septic peritonitis." *J Infect Dis* **191**(12): 2138-48.
- Vane, J. R. and R. M. Botting (1995). "A better understanding of anti-inflammatory drugs based on isoforms of cyclooxygenase (COX-1 and COX-2)." *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* **23**: 41-8.
- Waldburger, J. M. and G. S. Firestein (2010). "Regulation of peripheral inflammation by the central nervous system." *Curr Rheumatol Rep* **12**(5): 370-8.
- Wan, W., L. Janz, et al. (1993). "Differential induction of c-Fos immunoreactivity in hypothalamus and brain stem nuclei following central and peripheral administration of endotoxin." *Brain Res Bull* **32**(6): 581-7.
- Wang, H. L., Y. Q. Xing, et al. (2011). "The protective effect of lidocaine on septic rats via the inhibition of high mobility group box 1 expression and NF-kappaB activation." *Mediators Inflamm* **2013**: 570370.
- Watkins, L. R., E. P. Wiertelak, et al. (1994b). "Neurocircuitry of illness-induced hyperalgesia." *Brain Res* **639**(2): 283-99.
- Watkins, L. R., E. P. Wiertelak, et al. (1994a). "Characterization of cytokine-induced hyperalgesia." *Brain Res* **654**(1): 15-26.
- Waxman, S. G., T. R. Cummins, et al. (1999). "Sodium channels, excitability of primary sensory neurons, and the molecular basis of pain." *Muscle Nerve* **22**(9): 1177-87.
- Wehner, S., S. Straesser, et al. (2009). "Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase pathway as prophylaxis of postoperative ileus in mice." *Gastroenterology* **136**(2): 619-29.
- Wiertelak, E. P., B. Roemer, et al. (1997). "Comparison of the effects of nucleus tractus solitarius and ventral medial medulla lesions on illness-induced and subcutaneous formalin-induced hyperalgesias." *Brain Res* **748**(1-2): 143-50.
- Williams, R. M., H. R. Berthoud, et al. (1997). "Vagal afferent nerve fibres contact mast cells in rat small intestinal mucosa." *Neuroimmunomodulation* **4**(5-6): 266-70.
- Willis, W. D., E. D. Al-Chaer, et al. (1999). "A visceral pain pathway in the dorsal column of the spinal cord." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(14): 7675-9.
- Winter, C. A., E. A. Risley, et al. (1962). "Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs." *Proc Soc Exp Biol Med* **111**: 544-7.
- Woolf, C. J. (1983). "Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity." *Nature* **306**(5944): 686-8.
- Woolf, C. J. (1996a). "Phenotypic modification of primary sensory neurons: the role of nerve growth factor in the production of persistent pain." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **351**(1338): 441-8.
- Woolf, C. J. (1996b). "Windup and central sensitization are not equivalent." *Pain* **66**(2-3): 105-8.
- Woolf, C. J. and A. E. King (1990). "Dynamic alterations in the cutaneous mechanoreceptive fields of dorsal horn neurons in the rat spinal cord." *J Neurosci* **10**(8): 2717-26.
- Woolf, C. J. and S. W. Thompson (1991). "The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states." *Pain* **44**(3): 293-9.
- Xu, G. Y., J. H. Winston, et al. (2006). "Enhanced excitability and suppression of A-type K⁺ current of pancreas-specific afferent neurons in a rat model of chronic pancreatitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**(3): G424-31.
- Yang, J. P., M. Yao, et al. (2006). "Establishment of model of visceral pain due to colorectal distension and its behavioral assessment in rats." *World J Gastroenterol* **12**(17): 2781-4.
- Yu, Y. and W. C. de Groat (2008). "Sensitization of pelvic afferent nerves in the in vitro rat urinary bladder-pelvic nerve preparation by purinergic agonists and cyclophosphamide pretreatment." *Am J Physiol Renal Physiol* **294**(5): F1146-56.
- Yuan, T., Z. Li, et al. (2014). "Lidocaine attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in microglia." *J Surg Res* **192**(1): 150-62.
- Zagorodnyuk, V. P. and S. J. Brookes (2000). "Transduction sites of vagal mechanoreceptors in the guinea pig esophagus." *J Neurosci* **20**(16): 6249-55.

Zhang, H. and P. M. Dougherty (2011). "Acute inhibition of signalling phenotype of spinal GABAergic neurons by tumour necrosis factor-alpha." J Physiol **589**(Pt 18): 4511-26.

ARTICLE 1

A Comparison of Different Dosages of a Continuous Preperitoneal Infusion and Systemic Administration of Ropivacaine After Laparotomy in Rats

Toni Kfoury, MD,* Jean-Xavier Mazoit, MD, PhD,* Michael Schumacher, PhD,†
Dan Benhamou, MD,* and Helene Beloeil, MD, PhD*

INTRODUCTION: To further explain the mechanisms of action involved in the analgesic effect of a local anesthetic wound infusion, we evaluated parietal and visceral sensitivity as well as indices of inflammation after laparotomy and administration of a local anesthetic. Ropivacaine was administered at different dosages by a continuous infusion using a multiholed catheter in the preperitoneal position or systemically in rats.

METHODS: Nine groups of rats received 2 injections after laparotomy or sham surgery: (1) a bolus injection (ropivacaine or saline) via a preperitoneal catheter and (2) an IM injection (IM) (ropivacaine or saline). These injections were followed by a continuous infusion (ropivacaine or saline) in the preperitoneal catheter for 24 hours and 1 IM injection every 8 hours. Mechanical and visceral thresholds after stimulation were evaluated 3 times during the 48 hours after surgery. Stimulated production of tumor necrosis factor α , and interleukin 1β in whole-blood cultures were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The ropivacaine plasma concentration was measured by gas chromatography.

RESULTS: Preperitoneal infusion of high doses of ropivacaine and systemic ropivacaine similarly prevented mechanical and visceral sensitivity alterations and led to a better functional recovery. The analgesic effect of systemic administration was associated with an anti-inflammatory effect.

CONCLUSION: In the current study, high-dose ropivacaine administered via a preperitoneal infusion or systemic boluses had the same effect on mechanical and visceral sensitivity after laparotomy. Moreover, systemic administration was associated with an anti-inflammatory effect. The merits of the comparable benefit of systemic and high-dose preperitoneal infusion of ropivacaine need to be confirmed with further studies. (*Anesth Analg* 2011;113:617–25)

Local anesthetic wound infiltration has been described as a useful adjunct in a multimodal approach to postoperative pain management. A systematic review found that continuous wound catheters confer benefits, including improved analgesia, reduced opioid use and side effects, increased patient satisfaction, and reduced hospital stay.¹ This new modality of administration has expanded the indications for parietal infiltration to major painful procedures, such as laparotomy,² cardiac³ and thoracic surgery,⁴ major gynecologic surgery,⁵ breast augmentation,⁶ cesarean delivery,⁷ or spinal⁸ surgery. The mechanisms involved in the analgesic effect observed after direct application of local anesthetic to wounds are not fully understood. One can hypothesize that local anesthetics would directly block transmission of pain from nociceptive afferents from the wound surface. In addition, local anesthetics can inhibit the local inflammatory response to

injury, which can sensitize nociceptive receptors and contribute to pain and hyperalgesia.⁹ Moreover, when limited to the subcutaneous layers, local anesthetic wound infusion did not show any benefit after laparotomy.¹⁰ All together, these results suggested a crucial role of the peritoneum and the deep muscular layer on postoperative pain after laparotomy. The contribution of parietal and visceral pain in the global pain experienced after laparotomy and the links between these 2 components of pain have never been clearly evaluated. Experimental studies on rodents showed that parietal pain could sensitize neurons in the spinal cord to colonic distension.¹¹ One can hypothesize that inhibition of parietal nociceptive inputs could contribute to the inhibition of the visceral component of pain and therefore reduce the central sensitization phenomena. On the other hand, a systemic effect of the local anesthetic administered via the catheter cannot be excluded. Indeed, the benefits of the administration of systemic local anesthetics during laparotomy have been clearly demonstrated.¹²

To further explain the mechanisms of action involved in the analgesic effect of a local anesthetic wound infusion, we designed the following experimental study. We aimed to compare the effect of different doses of local anesthetic administered by a continuous infusion using a multiholed catheter in the preperitoneal position or systemically after laparotomy in rats. We evaluated mechanical and visceral thresholds after stimulation as well as indices of inflammation. To evaluate the systemic effect as one of the possible mechanisms of the analgesic effect of preperitoneal local anesthetic infusion, we chose to use

From the *Université Paris—Sud, Laboratoire d'Anesthésie, INSERM U788, Le Kremlin Bicêtre, France; and †UMR 788, INSERM, and Université Paris—Sud 11, Le Kremlin Bicêtre Cedex, France.

Accepted for publication March 31, 2011.

Funding: Mapar Association.

The authors declare no conflict of interest.

Reprints will not be available from the authors.

Address correspondence to Helene Beloeil, MD, PhD, Université Paris—Sud, Laboratoire d'Anesthésie, INSERM U788, Département d'anesthésie, 78 av du général Leclerc, F-94276 Le Kremlin Bicêtre, France. Address e-mail to helene.beloeil@chu-rennes.fr.

Copyright © 2011 International Anesthesia Research Society

DOI: 10.1213/ANE.0b013e31821f108a

Table 1. Summary of Treatment Groups

Group	Preperitoneal bolus (0.1 mL)	Continuous preperitoneal infusion	Systemic
Sham operated	—	—	—
Nonoperated control	—	—	—
Sham saline	Saline	Saline	Saline
Sham ropi 2	Ropivacaine 2 mg · mL ⁻¹	Ropivacaine 2 mg · mL ⁻¹ (total dose = 5 mg)	Saline
Sham ropi 7.5	Ropivacaine 7.5 mg · mL ⁻¹	Ropivacaine 7.5 mg · mL ⁻¹ (total dose = 18.75 mg)	Saline
Sham ropi IM	Saline	Saline	Ropivacaine 7.5 mg · mL ⁻¹ (total dose = 2.25 mg)
Laparotomy			
Saline	Saline	Saline	Saline
Ropi 2	Ropivacaine 2 mg · mL ⁻¹	Ropivacaine 2 mg · mL ⁻¹ (total dose = 5 mg)	Saline
Ropi 7.5	Ropivacaine 7.5 mg · mL ⁻¹	Ropivacaine 7.5 mg · mL ⁻¹ (total dose = 18.75 mg)	Saline
Ropi IM	Saline	Saline	Ropivacaine 7.5 mg · mL ⁻¹ (total dose = 2.25 mg)

ropivacaine as the local anesthetic administered either systemically or preperitoneally.

METHODS

This experimental, placebo-controlled study was performed with male Sprague–Dawley rats weighing 175 to 225 g (Elevage Janvier, Le Genest-St-Isle, France). Rats were housed with food and water available ad libitum and maintained on a 12-hour light–dark cycle. Rats were deprived of food but not water 12 hours before surgical operations. The Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Paris Sud-11 approved all experiments. After testing, all animals were euthanized by pentobarbital sodium overdose.

Solutions

Ropivacaine (Naropeine[®], AstraZeneca, Rueil Malmaison, France) at the final concentration of 2 mg · mL⁻¹ or 7.5 mg · mL⁻¹ was used.

Surgical Procedure

Rats were anesthetized with pentobarbital sodium 50 mg · kg⁻¹ (Centravet, Taden, France) administered intraperitoneally. Under general anesthesia, the abdominal wall was shaved and prepared in a sterile manner. A 4-cm midline laparotomy was performed. Once the peritoneal cavity was open, the viscera were gently manipulated for 2 to 3 minutes with the surgeon's index finger as previously described.¹³ The parietal peritoneal membrane was then closed with a 5 to 0 absorbable suture. A multiholed catheter with a 0.63-mm diameter was tunneled subcutaneously from the interscapular area to the abdominal wall incision and placed on the sutured parietal peritoneal membrane. The muscular layer was closed with 4 to 0 sutures as well as the skin with 5 to 0 sutures. The sham surgery consisted of an incision in the same area without opening the peritoneal cavity.

Experimental Groups

After surgery (laparotomy or sham), animals were randomly assigned to 1 of 9 groups according to the concentration and the route of administration of ropivacaine

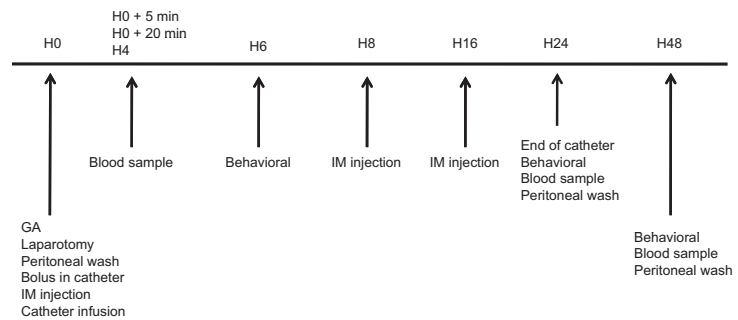
(Table 1). Solutions for injections were prepared and then coded by coinvestigators so that the primary investigator (T.K.) was blinded to the contents of the injectates. Each animal received 2 injections at time = 0: (1) a bolus injection via the catheter of 0.1 mL ropivacaine 2 mg · mL⁻¹ (group ropi 2) or ropivacaine 7.5 mg · mL⁻¹ (group ropi 7.5) or saline (groups ropi IM and saline) and² an IM injection (IM) of 0.1 mL saline (groups ropi 2, ropi 7.5, and saline) or of ropivacaine 7.5 mg · mL⁻¹ (group ropi IM). These injections were followed by a continuous infusion of 0.1 mL · h⁻¹ (ropivacaine or saline) in the preperitoneal catheter for 24 hours and 2 other IM injections (1 injection every 8 hours) of the designated solution according to the experimental group (Fig. 1 and Table 1). The total doses received by the animals were 5, 18.75, and 2.25 mg for the ropi 2, ropi 7.5, and ropi IM groups, respectively, during the first 24 hours. In the control group, the animals were only deprived of food. They experienced neither surgery nor injections.

Behavioral Measurement (n = 11 to 12 Animals/Group)

All behavioral tests were performed by a single investigator (T.K.) who was blinded to the study groups. Rats were isolated in individual cages. Mechanical and visceral thresholds after stimulation were evaluated 3 times during the 48 hours after surgery at 6 (day 0), 24 (day 1), and 48 (day 2) hours. For each test, the thresholds were determined 3 times, with testing separated by 10 minutes, and the mean withdrawal threshold was used for data analysis.

Visceral sensitivity was evaluated via colorectal distension (CRD). A CRD balloon was prepared according to the model described by Yang et al.¹⁴ The balloon covered with lubricant was totally inserted into the descending colon and rectum under isoflurane anesthesia. Rats were evaluated 30 minutes after they had fully recovered from anesthesia. The tube of the balloon was connected via a Y connector to an air pump and a sphygmomanometer. The balloon was progressively inflated with air under the control of the inside pressure that was continuously monitored. The test was stopped when the investigator observed a response (see below) or at the cutoff pressure of 80 mm Hg. The

Figure 1. Timing for interventions. GA = general anesthesia; IM = intramuscular; behavioral = behavioral measurement.



balloon was inflated with air for 20 seconds for each trial, and the pressure inside was continuously monitored. The pressure was determined 3 times, with testing separated by 10 minutes, and the mean pressure was used for data analysis.

Five abdominal withdrawal reflex (AWR) scores (AWR 0 to AWR 4) were used to assess the intensity of noxious visceral stimuli: AWR 0 = no remarkable behavior changes; AWR 1 = immobility of the rat body or occasional clinches of the head; AWR 2 = mild abdominal muscle contraction; AWR 3 = lifting the abdomen off the box platform or flattening of abdomen; AWR 4 = body arching or lifting pelvic structures off the platform.¹⁵ The threshold was defined as the minimal pressure inside the balloon when the rat showed flattening of abdomen (AWR 3) during the CRD.

Nociceptive mechanical threshold at the periphery of the abdominal scar was assessed by application of calibrated von Frey filaments. Animals were placed on a plastic mesh floor in individual plastic boxes and allowed to acclimate to their environment. Von Frey filaments were then applied vertically to the abdominal incision on 3 different points. Testing began with a small ($10 \text{ g} \cdot \text{mm}^{-2}$) filament. Filaments were applied 3 times over 2 seconds. If no response was elicited, a larger-diameter filament was applied in the same manner. The filaments were applied in increasing order until a positive response was elicited. The next filament was applied after the animal fully returned to its basal behavior. The maximum force applied was $137 \text{ g} \cdot \text{mm}^{-2}$. The threshold was determined 3 times, with testing separated by 10 minutes, and the mean threshold was used for data analysis. Abdominal withdrawal was considered a positive response.

A nonvalidated global activity score of 4 points was established and assigned to the rats. This score evaluated the following items: the activity of rats in their cage, their grooming behavior, and the condition of the hair. The score was established as follows:

1. The rat is moving in his cage only to eat. The hair bristles are dull and pale.
2. The rat is moving by lifting its abdomen off the cage platform. The hair bristles are dull and pale.
3. The rat is moving normally in its cage but it does not rear. The hair is smooth, shiny, and white.
4. The rat has a normal activity and can rear.

This score was assessed 3 times during the 48 hours after surgery just before pain evaluation: at day 0, after awakening from anesthesia for surgery, and at days 1 and 2. Rats were observed in their cages for 3 minutes without any stimulation. The highest observed score was recorded.

Cytokine Production in Stimulated Whole Blood Culture and in Stimulated Peritoneal Macrophages ($n = 8$ to 10 Animals/Groups/Time Point)

Blood (0.5 mL in heparin-coated syringe) was collected to measure inflammatory cytokines after stimulation of whole blood in isoflurane-anesthetized animals.

A blood sample (0.5 mL) was diluted 1:5 in Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 medium (PAA, Les Mureaux, France) supplemented with antibiotics (penicillin-streptomycin; Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). Five hundred microliter aliquots of diluted blood were cultured in 24-well plates under 2 different conditions¹: without lipopolysaccharide (LPS) (*Escherichia coli* O111:B4, $10 \mu\text{g}/\text{mL}$; Sigma) (baseline)² and with LPS in a 5% CO_2 incubator for 24 hours at 37°C . The supernatant was then harvested and stored at -80°C until assayed. The concentrations of tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)- 1β in the supernatants were measured with a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (ELISA) (DuoSet; R&D Systems Europe, Lille, France) according to the manufacturer's instructions. The assay detection limits were 30 pg/mL for TNF- α and 15 pg/mL for IL- 1β .

To harvest peritoneal macrophages, we washed the peritoneal cavity with 10 mL of cold Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) (PAA, Les Mureaux, France), which was aspirated soon thereafter. The PBS solution was centrifuged for 5 minutes at 750 revolutions per minute (rpm) and the cells were suspended in RPMI solution. The RPMI solution was cultured in 6-well cell culture plates and incubated for 3 hours at 37°C and 5% CO_2 to allow the macrophages to adhere to the plastic. The wells were then vigorously washed 3 times with PBS, and the adherent macrophages were harvested using a sterile cell scraper (Sarsted, Marnay, France). Macrophages were then suspended in RPMI at the concentration of 10^6 cells/mL. The cells were then stimulated with $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS (Sigma) and incubated overnight at 37°C and 5% of CO_2 . The

supernatant was collected and stored at -80°C until assayed using an ELISA specific for rat TNF- α and IL-1 β (R&D Systems Europe, Lille, France) as described above. Blood sampling and peritoneal wash were done 3 times: at the operation time just after peritoneal incision (day 0), 24 hours (day 1), and 48 hours (day 2) after surgery. The animals were killed after these destructive samplings.

Ropivacaine Plasma Concentration

Blood (0.5 mL) was sampled for ropivacaine assay in plasma in 7 animals per group 5 and 20 minutes (day 0) and 24 hours after the first IM injection (day 1) in the ropi IM group, and 4 hours (day 0), 24 hours (day 1), and 48 hours (day 2) after surgery in the ropi 2 and ropi 7.5 groups. The plasma was then collected and stored at -20°C until assayed by gas chromatography.

Statistics

Because the data were not normally distributed, statistical analysis was performed using nonparametric tests. In addition, to avoid a type 1 error, the use of global significance tests was preferred, and the Dunn test after the Kruskal–Wallis test was used only when necessary. The time evolution of CRD threshold, parietal pain threshold, and global activity in all sham-operated groups was tested using the Friedman test. To avoid unnecessary comparisons between groups of laparotomized rats, we tested only the time evolution in the saline group using the Friedman test. The comparison across the groups (in the sham-operated and laparotomy groups) at each time was performed using the Kruskal–Wallis test. Post hoc analysis was done using the Dunn test on ranks when necessary. Because measurement of cytokine production by circulating leukocytes (in the sham and laparotomy groups) and peritoneal macrophages (in the laparotomy groups) was done on the basis of destructive sampling, the time evolution in the control and saline groups was assessed by the Kruskal–Wallis test. The time evolution was not tested in the other laparotomy groups. The comparison among groups was assessed using the Kruskal–Wallis test followed by the Dunn test as appropriate. A P value <0.05 was considered the threshold level for statistical significance. Data are reported as the median and range. Statistical analysis was performed with Statview 5.0 and R.

RESULTS

Behavioral Tests

Visceral Stimulation: CRD Thresholds (Fig. 2)

Sham-Operated groups. In the nonoperated control group, CRD pressure reached the threshold (80 mm Hg) in all but 1 animal. This was significantly different from the value recorded in all sham-operated groups at day 0 (the first measurement after surgery). The other groups were not different from each other at any time. Only in group ropi IM was recovery complete with time (day 0 vs day 1 vs day 2). **Laparotomy groups.** In the saline group, CRD threshold was higher after laparotomy on day 1 and on day 2 than was the threshold observed on day 0. Six hours after laparotomy (day 0), CRD thresholds were significantly higher in the ropi 7.5 and the ropi IM groups in comparison with the saline and the ropi 2 groups. No significant difference was observed between the ropi 2 and the saline

groups and between the ropi IM and the ropi 7.5 groups. On day 1, the ropi 7.5 and the ropi IM groups were different from the saline group. On day 2, no difference was observed among groups when all groups had a threshold close to the limit (80 mm Hg).

Parietal Stimulation: Von Frey Filament Mechanical Withdrawal Thresholds (Fig. 3)

Sham-Operated groups. All animals in the control group reached the threshold of 110 g. However, the difference between the control group and the 4 laparotomized groups at day 0 did not reach statistical significance. The other groups were not different from each other at day 1 and at day 2. The sham ropi 7.5 group significantly recovered from day 0 to day 2.

Laparotomy groups. Parietal sensitivity evolved similarly to visceral sensitivity in the saline group: the threshold was higher on day 1 and on day 2 than was the threshold observed on day 0. Six hours after laparotomy (day 0), the thresholds were significantly higher in the ropi 7.5 and the ropi IM groups than they were in the saline and the ropi 2 groups. No significant difference was observed between the ropi 2 and the saline and ropi IM groups and between the ropi IM and the ropi 7.5 groups. On day 1, treated groups were different from the saline group. On day 2, treated groups were still different from the saline group. No difference among the 3 treated groups was observed on days 1 and 2.

Global Activity Score

Sham-Operated groups. In the control group, all animals had a score of 4, significantly different from sham-operated groups ($P < 0.0001$). The other groups were not different from each other at any time. All operated groups significantly recovered with time (day 0 vs day 1 vs day 2).

Laparotomy groups. Global activity evolved similarly to parietal and visceral stimulation in the saline group; the score was higher on day 1 and on day 2 than was the score observed on day 0. Six hours after laparotomy (day 0) the score was higher in all treated groups than in the saline group, assessing a better immediate functional postoperative recovery. On day 1 and day 2, the 3 treated groups were different from the saline group, and no difference was observed among treated groups.

Production of TNF- α and IL-1- β in Cultures of Circulating Blood Cells After LPS Stimulation (Fig. 4)

Concentrations of TNF- α and IL-1 β in cultured blood in the absence of LPS stimulation were always low in all of the study groups, indicating that incubation in the culture plates per se did not significantly stimulate cytokines.

Sham-Operated Groups

In the sham-operated groups, TNF- α and IL-1 β secreted by stimulated circulating leukocytes was not different between groups and between times (day 0, day 1, day 2).

Laparotomy Groups

In the saline group, TNF- α but not IL-1 β production significantly increased with time. TNF- α and IL-1 β production were similar among groups on day 0. TNF- α production on days 1 and 2 and IL-1 β production on day 2 were

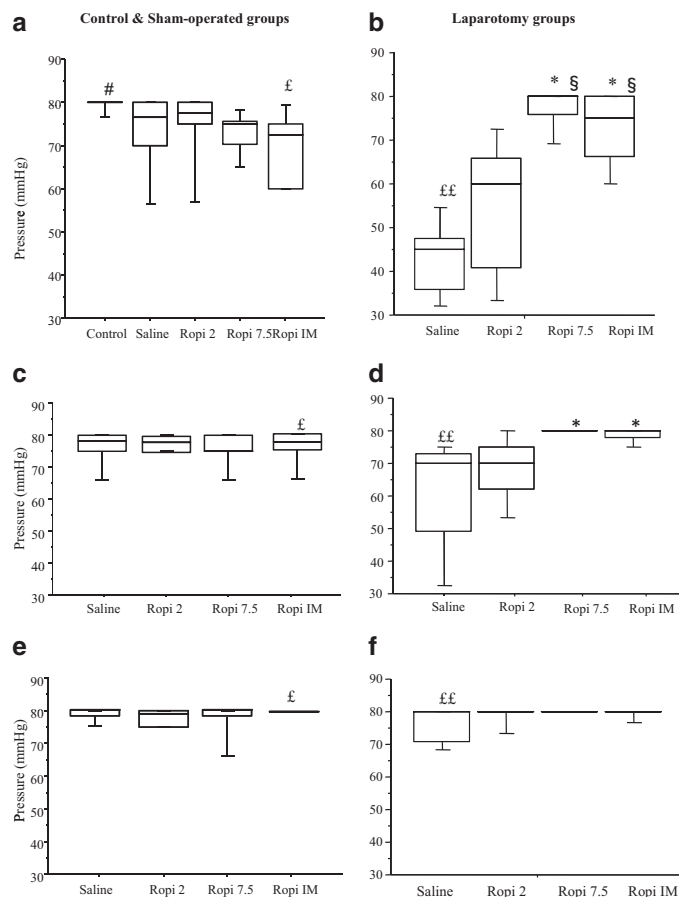


Figure 2. Colorectal distension assessing visceral sensitivity in the control, sham-operated, and laparotomy groups: pressure applied (mm Hg) to obtain an AWR (abdominal withdrawal reflex)-3 on day 0 (top) (a) (b), day 1 (middle) (c) (d), and day 2 (bottom) (e) (f). Results are expressed as median with range. Ropi = ropivacaine. # $P < 0.05$ vs the 4 sham-operated groups. £ $P < 0.05$ and ££ $P < 0.01$ across time (day 0 vs day 1 vs Day 2). * $P < 0.05$ vs laparotomy saline group. § $P < 0.05$ vs laparotomy ropi 2 group.

significantly lower in the ropi IM group than in the saline group, indicating a preventive effect of IM ropivacaine on systemic inflammation.

Production of TNF- α and IL-1- β by Macrophages in Peritoneal Liquid After LPS Stimulation (Fig. 5)

Sham-Operated Groups

In the sham-operated controls, the quantity of cells obtained after peritoneal wash was too low (<1 million/mL) to stimulate them.

Laparotomy Groups

In the saline group, TNF- α and IL1- β significantly increased with time.

TNF- α and IL-1 β production were similar between groups on day 0. TNF- α production on day 2 was significantly lower in the ropi 7.5 and the ropi IM groups than in the saline group. IL-1 β production on day 2 was significantly lower in the ropi IM group than in the saline group, indicating a preventing effect of IM ropivacaine on local inflammation.

Ropivacaine Plasma Concentrations

Ropivacaine was not detected at any time in the saline group. As usual in rodents, the ropivacaine plasma concentration was always low. Four hours after surgery the ropivacaine concentration was $0.06 \pm 0.06 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $0.16 \pm 0.11 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ in the ropi 2 and ropi 7.5 groups, respectively. At the end of preperitoneal infusion (H + 24 hours), the ropivacaine concentration was $0.03 \pm 0.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $0.05 \pm 0.08 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ in the ropi 2 and ropi 7.5 groups, respectively. In the ropi IM group, the ropivacaine plasma concentration was $0.42 \pm 0.49 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $0.44 \pm 0.27 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 5 and 20 minutes, respectively, after the first injection. The concentration was below the quantification limit 8 hours after the last injection for the ropi IM group and 24 hours after cessation of infusion for the ropi 2 and 7.5 groups.

DISCUSSION

Despite the increasing use of wound infiltration of local anesthetics as part of multimodal analgesia after major surgery, the mechanisms involved in the effect of a direct

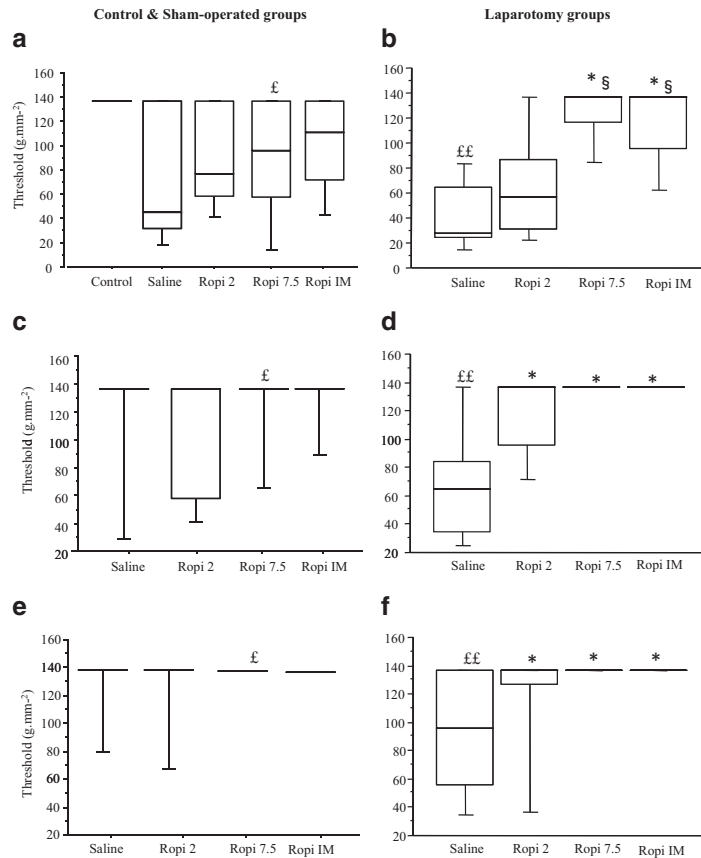


Figure 3. Pain threshold to von Frey filament (g) assessing parietal sensitivity in the control, sham-operated, and laparotomy groups on day 0 (top) (a) (b), day 1 (middle) (c) (d), and day 2 (bottom) (e) (f). Results are expressed as median with range. Ropi = ropivacaine. # $P < 0.05$ vs the 4 sham-operated groups. £ $P < 0.05$ and ££ $P < 0.01$ across time (day 0 vs day 1 vs day 2). * $P < 0.05$ vs laparotomy saline group. § $P < 0.05$ vs laparotomy ropi 2 group.

application of local anesthetics to the wound are not fully established. In the current study, high-dose ropivacaine administered via a preperitoneal infusion or systemic boluses leading to plasma concentration peaks had the same effect on mechanical and visceral sensitivity. Moreover, systemic administration was associated with a significant anti-inflammatory effect.

High-dose preperitoneal infusion and systemic ropivacaine prevented mechanical and visceral sensitivity alterations starting at day 0. The functional recovery measured by an activity score was simultaneously improved. The mechanisms involved in the efficacy of a preperitoneal infusion have not been clearly elucidated. First, it is not clear in which anatomic layer wound infusion has the best effect on postoperative pain; infusion above the superficial abdominal fascia was shown to provide better analgesia than was infusion below the fascia after hysterectomy.¹⁶ After a laparotomy, it seems that wound infusion limited to the subcutaneous layers does not provide any benefit.¹⁰ Local anesthetics could directly affect the peritoneal membrane, which could explain the inhibition of visceral pain. Studies have indeed suggested that the afferent limb of the reflex leading to a postoperative ileus originates primarily

from the peritoneum. A possible explanation of the analgesic effect of local anesthetic wound infiltration would be that blocking the transmission of pain from nociceptive afferents from the wound surface would allow an inhibition of visceral pain and therefore reduce the central sensitization phenomena. The influence of parietal and visceral pain in the global pain experienced after laparotomy and the links between these 2 components of pain have never been clearly evaluated, mostly because it is very difficult to distinguish between the 2 in clinical practice. The poor localization, diffuse character, and referral of visceral pain are explained in large part by the anatomical organization of the visceral innervation and the convergence of visceral and nonvisceral inputs onto second-order spinal neurons.¹⁷ It has moreover been shown that noxious cutaneous stimuli can inhibit visceral nociceptive neurons and reflexes.¹⁸ For example, a plantar incision of the hindpaw resulted in decreased plantar mechanical and thermal hyperalgesia and in a significant increase in the visceromotor response to CRD.¹⁹ In our study, the inhibition of parietal sensitivity via a preperitoneal infusion was associated with an inhibition of visceral sensitivity, leading to the conclusion that both could be linked. However, the

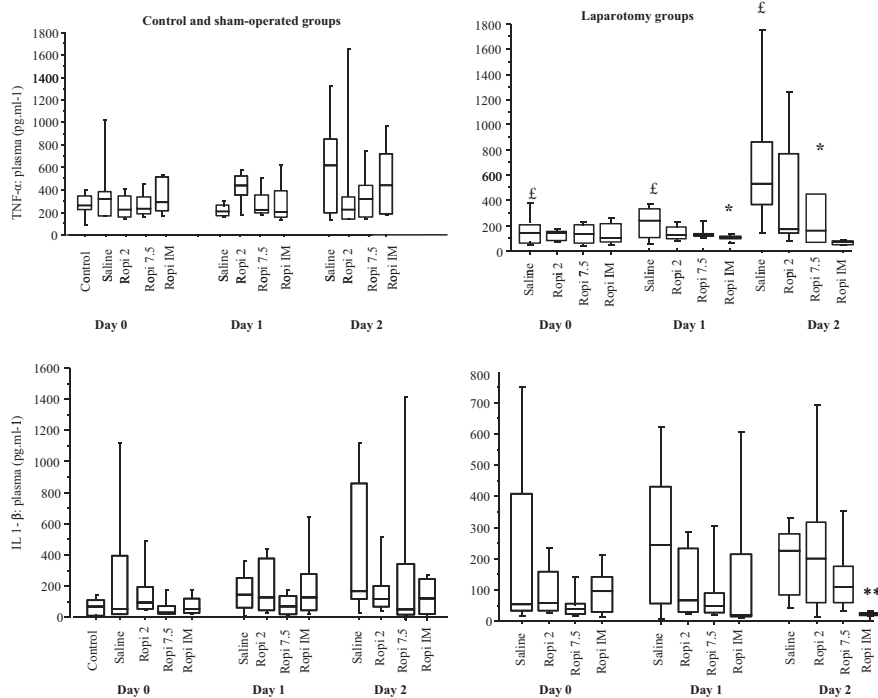


Figure 4. Tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-1 β production by leukocytes in the control, sham-operated, and the laparotomy groups. Whole-blood cells were stimulated with lipopolysaccharide (LPS) and the cytokine concentration supernatant measured 24 hours after. Blood was sampled on days 0, 1, and 2. Results are expressed as median with range. Ropi = ropivacaine. £ $P < 0.05$ across time (day 0 vs day 1 vs day 2). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs laparotomy saline group.

mechanistic hypothesis that local anesthetic wound infiltration could inhibit parietal pain and therefore visceral pain cannot be confirmed by our study. Indeed, the plasma concentration of ropivacaine in the ropi 7.5 group was not negligible even if lower than in the ropi IM group. We thus cannot exclude a systemic effect of ropivacaine administered via a catheter. The benefits of the administration of systemic local anesthetics (i.e., lidocaine) during laparotomy have been clearly demonstrated in patients.¹²

This prevention of mechanical and visceral sensitivity alterations was associated with an anti-inflammatory effect of local anesthetics. In the current study, increased production of TNF- α and IL-1 β in cultures of circulating blood cells and in peritoneal macrophages after LPS stimulation in rats after a laparotomy was completely prevented by systemic ropivacaine treatment. A nonsignificant tendency towards an anti-inflammatory effect was observed after a high-dose preperitoneal infusion. Inflammation is the most important component of postoperative pain and can sensitize nociceptive receptors and contribute to pain and hyperalgesia. Local anesthetics can inhibit the local and systemic inflammatory response to injury when administered via a nerve block.⁹ The mechanisms involved probably imply an inhibition of the axonal transport of inflammatory

mediators.²⁰ When administered systemically, local anesthetics did not show any benefit after orthopedic surgery in patients.²¹ However, continuous IV administration of lidocaine during and after abdominal surgery improves patient rehabilitation and shortens hospital stay.¹² Kuo et al.²² showed that the improvement in pain and bowel function observed after intraoperative administration of systemic lidocaine is associated with a decrease in cytokines release. The effects on cytokines were observed until 72 hours after the last administration of lidocaine. The potential mechanisms explaining the benefit of systemic administration of local anesthetics could involve an inhibition of central hyperalgesia²³ and of inflammation. Indeed systemic lidocaine can specifically produce inhibition of neuronal and reflex responses to CRD.²⁴ As previously shown,²⁵ the analgesic and functional benefit of systemic administration of local anesthetic was associated with an anti-inflammatory effect in the current study. This could be explained by the ropivacaine plasma concentrations. Indeed, despite a much lower total dose received by ropi IM animals, the peak concentration (C_{max}) after each injection was remarkably higher than was the steady concentration observed in the 2 other groups. If we consider that the time to C_{max} occurred between 5 and 20 minutes after the IM injection, C_{max} was

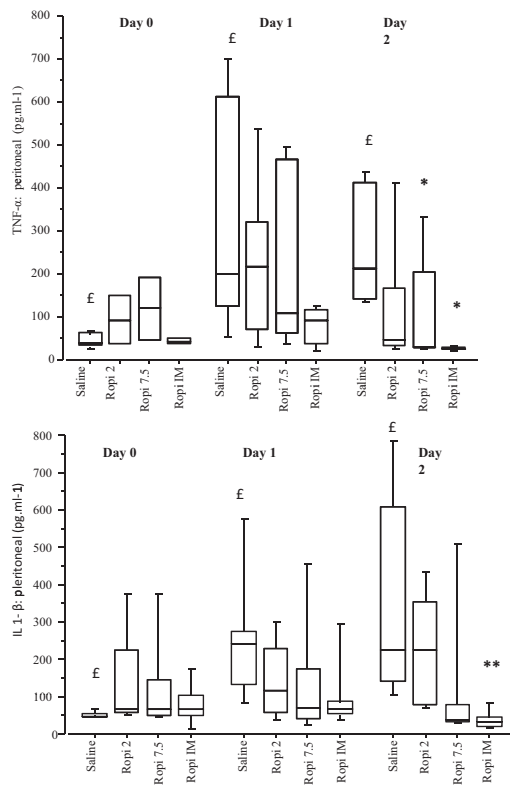


Figure 5. Tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)- 1β production by peritoneal macrophages in the laparotomy groups. Macrophages were harvested by peritoneal wash on days 0, 1, and 2 and cultured in the presence of lipopolysaccharide (LPS) and the cytokine concentration supernatant measured 24 hours after. Results are expressed as median with range. Ropi = ropivacaine. $fP < 0.05$ and $f\mathbb{E}P < 0.01$ across time (day 0 vs day 1 vs day 2). $*P < 0.05$ and $**P < 0.01$ vs laparotomy saline group.

higher than $0.44 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and a peak effect may explain why the animals in this group had similar results to those in the ropi 7.5 group. The very low concentrations observed in the groups receiving a preperitoneal infusion could probably not lead to an anti-inflammatory effect.

The current study had some limitations. First, we arbitrarily chose a small dose of ropivacaine administered systemically to obtain an analgesic efficacy without any side effects. The toxic plasma level in rats is $>10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.²⁶ The systemic route is not used for the administration of ropivacaine in clinical practice. To evaluate the action of systemic ropivacaine as one of the possible mechanisms of the analgesic affect of preperitoneal ropivacaine, we chose to keep ropivacaine as the local anesthetic administered systemically in our study. Second, for technical reasons, we chose not to use continuous systemic administration of local anesthetic. It would have been technically difficult in rats. Finally, we did not directly assess pain but rather the behavioral responses to visceral and parietal stimulation. However, a recent article

showed that postoperative signs of pain (persistent tachycardia, increased heart rate variability, and loss of mobility) were associated over time with mechanical hyperalgesia measured with von Frey filaments in rats after laparotomy.²⁷

In conclusion, we did not find any difference between high-dose ropivacaine administered via a preperitoneal infusion or systemic boluses after laparotomy in rats. The merits of the comparable benefit of systemic and high-dose preperitoneal infusion of ropivacaine need to be confirmed with further studies. Infusion catheters are expensive, and no data are available on the safety of high doses in patients. However, side effects are very scarce. On the other hand, systemic administration of local anesthetics (lidocaine in patients) is inexpensive but causes higher plasma levels of local anesthetic and thus potential side effects. The choice between the 2 techniques needs to be evaluated in patients. ■■

DISCLOSURES

Name: Toni Kfoury, MD.

Contribution: This author helped conduct the study.

Attestation: Toni Kfoury has seen the original study data, reviewed the analysis of the data, and approved the final manuscript.

Name: Jean-Xavier Mazoit, MD, PhD.

Contribution: This author helped design the study and analyze the data.

Attestation: Jean-Xavier Mazoit has seen the original study data, reviewed the analysis of the data, and approved the final manuscript.

Name: Michael Schumacher, PhD.

Contribution: This author helped review the manuscript.

Attestation: Michael Schumacher has seen the original study data, reviewed the analysis of the data, and approved the final manuscript.

Name: Dan Benhamou, MD.

Contribution: This author helped review the manuscript.

Attestation: Helene Beloeil has seen the original study data, reviewed the analysis of the data, and approved the final manuscript.

Name: Helene Beloeil, MD, PhD.

Contribution: This author helped design the study, analyze the data, and write the manuscript.

Attestation: Helene Beloeil has seen the original study data, reviewed the analysis of the data, approved the final manuscript, and is the author responsible for archiving the study files.

REFERENCES

- Liu SS, Richman JM, Thirlby RC, Wu CL. Efficacy of continuous wound catheters delivering local anesthetic for postoperative analgesia: a quantitative and qualitative systematic review of randomized controlled trials. *J Am Coll Surg* 2006;203:914–32
- Beaussier M, El' Ayoubi H, Schiffer E, Rollin M, Parc Y, Mazoit JX, Azizi L, Gervaz P, Rohr S, Biermann C, Lienhart A, Eledjam JJ. Continuous preperitoneal infusion of ropivacaine provides effective analgesia and accelerates recovery after colorectal surgery: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Anesthesiology* 2007;107:461–8
- White PF, Rawal S, Latham P, Markowitz S, Issioui T, Chi L, Dellaria S, Shi C, Morse L, Ing C. Use of a continuous local anesthetic infusion for pain management after median sternotomy. *Anesthesiology* 2003;99:918–23

4. Wheatley GH 3rd, Rosenbaum DH, Paul MC, Dine AP, Wait MA, Meyer DM, Jessen ME, Ring WS, DiMaio JM. Improved pain management outcomes with continuous infusion of a local anesthetic after thoracotomy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;130:464-8
5. Fredman B, Shapiro A, Zohar E, Feldman E, Shorer S, Rawal N, Jedeikin R. The analgesic efficacy of patient-controlled ropivacaine instillation after Cesarean delivery. *Anesth Analg* 2000;91:1436-40
6. Rawal N, Gupta A, Helsing M, Grell K, Allvin R. Pain relief following breast augmentation surgery: a comparison between incisional patient-controlled regional analgesia and traditional oral analgesia. *Eur J Anaesthesiol* 2006;23:1010-7
7. Lavand'homme PM, Roelants F, Waterloos H, De Kock MF. Postoperative analgesic effects of continuous wound infiltration with diclofenac after elective Cesarean delivery. *Anesthesiology* 2007;106:1220-5
8. Bianconi M, Ferraro L, Ricci R, Zanolli G, Antonelli T, Giulia B, Guberti A, Massari L. The pharmacokinetics and efficacy of ropivacaine continuous wound instillation after spine fusion surgery. *Anesth Analg* 2004;98:166-72
9. Beloeil H, Ababneh Z, Chung R, Zurakowski D, Mulkern RV, Berde CB. Effects of bupivacaine and tetrodotoxin on carrageenan-induced hind paw inflammation in rats (part 1): hyperalgesia, edema, and systemic cytokines. *Anesthesiology* 2006;105:128-38
10. Fredman B, Zohar E, Tarabykin A, Shapiro A, Mayo A, Klein E, Jedeikin R. Bupivacaine wound instillation via an electronic patient-controlled analgesia device and a double-catheter system does not decrease postoperative pain or opioid requirements after major abdominal surgery. *Anesth Analg* 2001;92:189-93
11. Peles S, Miranda A, Shaker R, Sengupta JN. Acute nociceptive somatic stimulus sensitizes neurones in the spinal cord to colonic distension in the rat. *J Physiol* 2004;560:291-302
12. Marret E, Rolin M, Beaussier M, Bonnet F. Meta-analysis of intravenous lidocaine and postoperative recovery after abdominal surgery. *Br J Surg* 2008;95:1331-8
13. Roughan JV, Flecknell PA. Behavioural effects of laparotomy and analgesic effects of ketoprofen and carprofen in rats. *Pain* 2001;90:65-74
14. Yang JP, Yao M, Jiang XH, Wang LN. Establishment of model of visceral pain due to colorectal distension and its behavioral assessment in rats. *World J Gastroenterol* 2006;12:2781-4
15. Al-Chaer ED, Kawasaki M, Pasricha PJ. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development. *Gastroenterology* 2000;119:1276-85
16. Hafizoglu MC, Katircioglu K, Ozkalkanli MY, Savaci S. Bupivacaine infusion above or below the fascia for postoperative pain treatment after abdominal hysterectomy. *Anesth Analg* 2008;107:2068-72
17. Ness TJ, Gebhart GF. Visceral pain: a review of experimental studies. *Pain* 1990;41:167-234
18. Ness TJ, Gebhart GF. Interactions between visceral and cutaneous nociception in the rat: II. Noxious visceral stimuli inhibit cutaneous nociceptive neurons and reflexes. *J Neurophysiol* 1991;66:29-39
19. Cameron DM, Brennan TJ, Gebhart GF. Hind paw incision in the rat produces long-lasting colon hypersensitivity. *J Pain* 2008;9:246-53
20. Deruddre S, Combettes E, Estebe JP, Duranteau J, Beloeil H, Mazoit JX. Effects of a bupivacaine nerve block on the axonal transport of Tumor Necrosis factor- α (TNF- α) in a rat model of carrageenan-induced inflammation. *Brain Behav Immun* 2010;24:652-9
21. Martin F, Cherif K, Gentili ME, Enel D, Abe E, Alvarez JC, Mazoit JX, Chauvin M, Bouhassira D, Fletcher D. Lack of impact of intravenous lidocaine on analgesia, functional recovery, and nociceptive pain threshold after total hip arthroplasty. *Anesthesiology* 2008;109:118-23
22. Kuo CP, Jao SW, Chen KM, Wong CS, Yeh CC, Sheen MJ, Wu CT. Comparison of the effects of thoracic epidural analgesia and i.v. infusion with lidocaine on cytokine response, postoperative pain and bowel function in patients undergoing colonic surgery. *Br J Anaesth* 2006;97:640-6
23. Koppert W, Ostermeier N, Sittl R, Weidner C, Schmelz M. Low-dose lidocaine reduces secondary hyperalgesia by a central mode of action. *Pain* 2000;85:217-24
24. Ness TJ. Intravenous lidocaine inhibits visceral nociceptive reflexes and spinal neurons in the rat. *Anesthesiology* 2000;92:1685-91
25. Herroeder S, Pecher S, Schonherr ME, Kaulitz G, Hahnenkamp K, Friess H, Bottiger BW, Bauer H, Dijkgraaf MG, Durieux ME, Hollmann MW. Systemic lidocaine shortens length of hospital stay after colorectal surgery: a double-blinded, randomized, placebo-controlled trial. *Ann Surg* 2007;246:192-200
26. Ohmura S, Kawada M, Ohta T, Yamamoto K, Kobayashi T. Systemic toxicity and resuscitation in bupivacaine-, levobupivacaine-, or ropivacaine-infused rats. *Anesth Analg* 2001;93:743-8
27. Charlet A, Rodeau JL, Poisbeau P. Radiotelemetric and symptomatic evaluation of pain in the rat after laparotomy: long-term benefits of perioperative ropivacaine care. *J Pain* 2010;12:246-56

ARTICLE 2

Regional Anesthesia and Pain Medicine
Parietal block in the rat: an anatomical, behavioral and histological study
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Parietal block in the rat: an anatomical, behavioral and histological study
Article Type:	Original Article
Corresponding Author:	jean Xavier Mazoit, M.D., Ph.D. Universite Paris-Sud Bicêtre, France FRANCE
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universite Paris-Sud
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	jean Xavier Mazoit, M.D., Ph.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	jean Xavier Mazoit, M.D., Ph.D. Toni Kfoury, M.D. Meriem Bouzidi, MSc Paul Zetlaoui, M.D. Dan Benhamou, M.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	<p>Background and Objectives: Animal models of regional anesthesia are useful for studying the effects of blocks and improve their efficacy. The aim of our experiments was to validate a multi-site paravertebral block in the rat.</p> <p>Methods: Dissection and indigo carmine dye injection were performed in five rats. In other groups, after carrageenan injection in the abdominal wall, bupivacaine or saline was injected laterally to the spinal column at the T5, T10, L1, L4 and S1 level. The efficacy of the block on mechanical nociception was measured using von Frey hairs. In addition, we measured c-Fos immunoreactive nuclei in the cord.</p> <p>Results: The multi-site injection showed a peri nervous distribution of the injected solution without intra thoracic, intra abdominal or epidural diffusion. Bilateral block with a relatively small volume of bupivacaine (0.5 ml) significantly increased the threshold to mechanical pain as compared to control and significantly decreased the number of c-Fos immunoreactive nuclei in the posterior horn of the spinal cord.</p> <p>Conclusions: This study shows that a parietal abdominal wall block is easy to perform in the rat. This block allows investigators to explore the mechanisms of action of abdominal parietal wall blocks.</p>

Parietal block in the rat: an anatomical, behavioral and histological study.

Toni T Kfoury M.D.,^{1,2} Meriem Bouzidi,² Paul J Zetlaoui M.D.,¹ Dan Benhamou M.D.,¹ Jean Xavier Mazoit M.D., Ph.D.^{1,2}

1 Département d'Anesthésie-Réanimation, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud AP-HP France.

2 Laboratoire d'Anesthésie, INSERM UMR 1195, Faculté de Médecine, Université Paris-Sud France.

Corresponding author: Jean Xavier Mazoit Laboratoire d'Anesthésie, Faculté de Médecine, 63 rue Gabriel Péri 94276 Bicêtre Cedex, France.

From the laboratoire d'Anesthésie, INSERM UMR 1195, Faculté de Médecine, Université Paris-Sud France.

The experiments were granted by the INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) and the MAPAR (Mises au Point en Anesthésie et Réanimation).

Running Head: Parietal block in the rat.

Abstract.

Background and Objectives: Animal models of regional anesthesia are useful for studying the effects of blocks and improve their efficacy. The aim of our experiments was to validate a multi-site paravertebral block in the rat.

Methods: Dissection and indigo carmine dye injection were performed in five rats. In other groups, after carrageenan injection in the abdominal wall, bupivacaine or saline was injected laterally to the spinal column at the T5, T10, L1, L4 and S1 level. The efficacy of the block on mechanical nociception was measured using von Frey hairs. In addition, we measured c-Fos immunoreactive nuclei in the cord.

Results: The multi-site injection showed a peri nervous distribution of the injected solution without intra thoracic, intra abdominal or epidural diffusion. Bilateral block with a relatively small volume of bupivacaine (0.5 ml) significantly increased the threshold to mechanical pain as compared to control and significantly decreased the number of c-Fos immunoreactive nuclei in the posterior horn of the spinal cord.

Conclusions: This study shows that a parietal abdominal wall block is easy to perform in the rat. This block allows investigators to explore the mechanisms of action of abdominal parietal wall blocks.

Parietal abdominal nerve blocks improve analgesia in patients undergoing abdominal, gynecological and urological surgery.¹⁻⁵ Animal models of regional anesthesia are useful for studying the effects of the block on nociception, behavior and inflammation.¹ Discrimination between the effects of sensory block and anti-inflammatory properties of local anesthetics needs adapted models aiming at discriminate between different mechanisms. During abdominal surgery, pain has several components; the first is due to abdominal wall injury and the second and third are related to visceral and parietal peritoneal inflammation respectively.⁶⁻⁸

Rats (usually of the Sprague-Dawley strain) are the most commonly used animals to study pain because of their size adapted to the behavioral experiments.⁹ However, anatomical, behavioral and biochemical differences between humans and rodents makes the comparison sometimes difficult. Thalhammer et al performed a neurologic evaluation of the rat during sciatic nerve block.¹⁰ They showed that this strain was an excellent model for the study of behavior after the realization of a nerve block. However, anatomical differences between rats and humans at the spine and abdominal wall muscles level may induce discrepancies between human and rat models.^{11,12} It is why the goal of our study was to validate a new model of abdominal wall regional block in the rat. We performed a multi-injection block from T5 to S1. In a first part we studied the anatomy of parietal wall innervation and in a second part we studied the effect of the block on an inflammatory injury of the abdominal wall using bupivacaine.

METHODS

This placebo-controlled experiment was performed on male Sprague-Dawley rats weighing 175 to 225 g (Elevage Janvier, Le Genest-St-Isle, France). Rats were housed with food and water available ad libitum and maintained on a 12 h light-dark cycle. Rats were handled repeatedly over at least three days before experiments to habituate them to investigators and to the testing paradigm. Our local institutional Animal Care and Use Committee (CEEA 26, Paris-Sud) approved all experiments. After testing, all animals were euthanized using an overdose of pentobarbital sodium.

Drugs and chemicals

Bupivacaine 0.25% with epinephrine 1:200000 was from Mylan, Saint Priest, France; carrageenan (2.5% wt/vol solution of lambda carrageenan in saline) was from Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier France; indigo carmine was from SERB laboratories, Paris, France); pentobarbital sodium was Centravet, Taden, France.

Anatomical study:

Six adult Sprague Dawley rats were included in the anatomical study. Rats were anesthetized with intra peritoneal (i.p.) pentobarbital, 50mg/kg. The abdominal wall and the back were shaved and the block was performed with the rat in a ventral position. Injections were performed on both sides of the vertebral column 3 mm laterally to the spinal process of T5, T10, L1, L4 and S1. The last rib, and then, the spinal process of T13 vertebra were first identified by palpation. The spinal processes of T5, T10, L1, L4, and S1 vertebrae were identified and the skin in front of these vertebrae was labeled with a skin pencil. Indigo carmine (1:6000 in normal saline) was injected on both sides of each labeled vertebrae in a perpendicular direction to the skin using a 23gauge needle. The solution was injected once the needle crossed the first muscular layer.

Abdominal wall block and carrageenan injection.

Rats were anesthetized using pentobarbital sodium 50 mg/kg i.p. Then, the block was performed as previously described and bupivacaine (12.5 mg/kg) was equally distributed between injection sites. Once bupivacaine was injected, the rat was settled on the back. Carrageenan or saline was injected

on both sides at a point 1/3 from midline on the bisector of the angle formed by the intersection between the line joining the 2 anterior superior iliac crests (horizontal line) and the linea Alba (Figure1). 0.5ml freshly prepared carrageenan was injected on each side of the abdominal wall under the skin and between abdominal wall muscular layers.

Experimental groups

For the behavioral experiment, animals (n = 7 /group) were randomly assigned to receive saline or bupivacaine 12.5 mg/kg for the block. The same pattern of experiment was repeated for c-Fos study using 8 animals/group.

Parietal pain assessment

Mechanical pain was assessed by application of calibrated von Frey filaments 6 hours after inflammatory insult. von Frey filaments were applied vertically to the abdominal wall on 2 different points on both sides of the abdominal wall where carrageenan was injected. Testing began with a small (10 g.mm⁻²) filament. The filaments were applied in increasing order until the abdominal wall withdrawal was elicited, which was considered as a positive response. The maximum force applied was 137.3 g.mm⁻². The withdrawal threshold was determined three times, at ten minutes intervals, and the mean withdrawal threshold was used for data analysis.

c-Fos experiment

Two hours following carrageenan administration, rats were deeply anaesthetized with sodium pentobarbital (50 mg kg⁻¹ i.p.) and perfused intracardially with 300 ml of 0.6 M phosphate-buffered saline (PBS) followed by 300 ml of ice-cold fixative (4% paraformaldehyde in 0.6 M phosphate buffer – PAF 4%) at a rate of 1 ml s⁻¹. The spinal cord was removed and postfixed in the same fixative overnight. The spinal cord was then cut in slices of two metamers before paraffin inclusion. Serial transverse sections of 8 µm were cut using a vibratom (Thermo Microtome, Microm HM340E). After wax removal and rehydration, the sections were washed twice with 0.15 M PBS solution and immersed in 2% H₂O₂ for 30 min. The sections were pre-treated with 1% normal goat serum (Vector

Laboratories) and 0.3% Triton X-100 in 0.15 M PBS (NGST) for 2 h, then incubated for 20 h at room temperature with rabbit polyclonal antibody directed against c-Fos protein at a concentration of 50 µg/ml (Merck Millipore, Fontenay sous bois, France). The incubated sections were washed three times in PBS and incubated in biotinylated goat anti-rabbit 1:500 (Vector Laboratories, Burlingame, USA) in NGST for 1 h at room temperature, then washed twice in PBS and incubated for 1 h in avidin–biotin-peroxidase complex (Vectastain Elite ABC PK-6100, Vector Laboratories). Finally, the sections were developed in diaminobenzidine (0.035%) solution (SK-4600; Vector Laboratories). The sections were mounted on adhesion microscope slides SuperFrost plus (Roth laboratories, Lauterbourg, France), and coverslipped. Spinal cord sections from the different experimental conditions were processed concurrently to control for variability in staining intensity. Four sections corresponding to each two-metamer segment and exhibiting the greatest number of labeled cells were selected from each rat. The selection of sections and quantification of the number of c-Fos positive cells in the superficial (I-II) and deep (V-VI) laminae of the dorsal horn were performed by an investigator blind to the experimental condition. c-Fos positive cells were localized under light-field microscopy at 10x et 40x. Labeled nuclei were counted using a microscope (Nikon, Eclipse E2000) regardless of staining intensity.

Statistics

The number of animals in each group was calculated considering a power of 90 %, an expected difference of 0.5 for both behavior and c-Fos experiments and a standard deviation of 0.5 for behavior and 0.2 for c-Fos. The normality of data was checked using the Shapiro test and qq plots for c-Fos. Group comparisons were performed using the Mann-Whitney test for behavior and ANOVA, followed by the Tukey test for c-Fos experiments. Data are reported as the median and centiles for von Frey and mean and standard error of the mean for c-Fos experiments.

RESULTS

Anatomical study (Figure 2):

The dissection of three adult rats confirmed that innervation of the abdominal wall (including the anterior pelvic wall) arises from T5 to S1. Nerves pass under the paravertebral muscles before entering the abdominal wall between the transversus abdominis and the internal oblique muscles).

After injection of indigo carmine dye, the dissection of two other rats showed that injection below paravertebral muscles insures a peri nervous distribution of the injected solution. A multi site injection with a relatively small volume (0.5 ml) allowed a peri nervous distribution of the injected solution without intra thoracic, intra abdominal or epidural diffusion.

Parietal pain assessment:

Mechanical withdrawal thresholds: All animals in both groups reached the threshold of 137g/mm² before carrageenan injection. Six hours after inflammatory insult induction, animals in the bupivacaine group showed a significantly higher withdrawal threshold than those in the control group (Figure 3a).

Immunohistological staining:

The expression of c-Fos at different level of the spinal cord was significantly inhibited in rats receiving bupivacaine in comparison with rats receiving normal saline in their parietal block (Figure 3b).

Discussion:

The present observation of the abdominal wall innervation corresponds to the descriptions of Greene and of Rizk.^{11,12} This finding allows us to propose a multisite injection nerve block of the abdominal wall. The small volume of local anesthetic solution injected at each site (0.5 ml) guarantees a limited distribution to the peri neural space. It is likely that, the use of larger local anesthetic volume may induce the risk of intra abdominal, intra thoracic or even epidural diffusion.

Carrageenan has been widely used to induce an inflammatory insult in both peripheral or peritoneal pain model.¹⁴⁻¹⁷ In a peripheral pain model, hyperalgesia at the site of injection and increased c-Fos immunoreactive nuclei in the spinal cord was recorded two hours after carrageenan injection.¹⁸ Sciatic nerve block using bupivacaine has proved efficacy to treat and prevent pain and hyperalgesia induced by carrageenan injection in rat hind paw.¹⁴ Our results show that our five-site injection block has an antinociceptive effect similar in intensity to that observed at the lower limb after a sciatic nerve block.

c-Fos staining in the cord also confirms that the abdominal wall innervation in the rat extends from T5 to S1. c-Fos, the protein of the proto-oncogene c-fos has been extensively used as a marker of activation of nociceptive neurons in the spinal cord for more than twenty years since Hunt et al. first reported that parietal noxious stimulation to a hind paw of rats leads to marked induction of c-Fos in superficial and deep dorsal horn neurons.¹⁹ More generally, c-Fos is a marker of neural activation following noxious stimulation and tissue injury.²⁰ Our proposed parietal abdominal nerve block using bupivacaine decreased the number of immunoreactive c-Fos nuclei in the cord. Despite a marked difference in the spinal cord anatomy between rats and humans, the validation of this multi-site block in the rat could open the door to experimental studies, with the possibility of linking the results between the two species.

In conclusion, this study shows that a parietal abdominal wall block is easy to perform in the rat. This block allows investigators to explore the mechanisms of action of abdominal parietal wall blocks, with

possible implications in humans.

REFERENCES

1. Coutaux A, Adam F, Willer JC, Le Bars D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine*. 2005;72:359-371.
2. McDonnell JG, O'Donnell B, Curley G, Heffernan A, Power C, Laffey JG. The analgesic efficacy of transversus abdominis plane block after abdominal surgery: a prospective randomized controlled trial. *Anesth Analg*. 2007;104:193-197.
3. Mishriky BM, George RB, Habib AS. Transversus abdominis plane block for analgesia after Cesarean delivery: a systematic review and meta-analysis. *Can J Anaesth*. 2012;59:766-778.
4. Baik JS, Oh AY, Cho CW, Shin HJ, Han SH, Ryu JH. Thoracic paravertebral block for nephrectomy: a randomized, controlled, observer-blinded study. *Pain Med*. 2014;15:850-856.
5. Bhattacharjee S, Ray M, Ghose T, Maitra S, Layek A. Analgesic efficacy of transversus abdominis plane block in providing effective perioperative analgesia in patients undergoing total abdominal hysterectomy: A randomized controlled trial. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*. 2014;30:391-396.
6. Williams PL.: *Gray's anatomy*. 38th (eight) ed. London, UK, Churchill livingston, 1995.
7. Boeckstaens GE, de Jonge WJ. Neuroimmune mechanisms in postoperative ileus. *Gut*. 2009;58:1300-1311.
8. Tanaka K, Matsugami T, Chiba T. The origin of sensory innervation of the peritoneum in the rat. *Anat Embryol (Berl)*. 2002;205:307-313.
9. Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev*. 2001;53:597-652.
10. Thalhammer JG, Vladimirova M, Bershinsky B, Strichartz GR. Neurologic evaluation of the rat during sciatic nerve block with lidocaine. *Anesthesiology*. 1995;82:1013-1025.

11. Greene EC: *Anatomy of the rat*. Transactions of the American Philosophical Society, New Series, Volume XXVII Philadelphia, PA, 1935.
12. Rizk NN. A new description of the anterior abdominal wall in man and mammals. *J Anat*. 1980;131:373-385.
13. Brown SH, Banuelos K, Ward SR, Lieber RL. Architectural and morphological assessment of rat abdominal wall muscles: comparison for use as a human model. *J Anat*. 2010;217:196-202.
14. Gentili ME, Mazoit JX, Samii K K, Fletcher D. The effect of a sciatic nerve block on the development of inflammation in carrageenan injected rats. *Anesth Analg*. 1999;89:979-984.
15. Pagano RL, Dias MA, Dale CS, Giorgi R. Neutrophils and the calcium-binding protein MRP-14 mediate carrageenan-induced antinociception in mice. *Mediators Inflamm*. 2002;11:203-210.
16. Beloeil H, Asehnoune K, Moine P, Benhamou D, Mazoit JX. Bupivacaine's action on the carrageenan-induced inflammatory response in mice: cytokine production by leukocytes after ex-vivo stimulation. *Anesth Analg*. 2005;100:1081-1086.
17. Beloeil H, Ji RR, Berde CB. Effects of bupivacaine and tetrodotoxin on carrageenan-induced hind paw inflammation in rats (Part 2): cytokines and p38 mitogen-activated protein kinases in dorsal root ganglia and spinal cord. *Anesthesiology*. 2006;105:139-145.
18. Pham-Marcou TA, Beloeil H, Sun X, Gentili M, Yaici D, Benoit G, Benhamou D, Mazoit JX. Antinociceptive effect of resveratrol in carrageenan-evoked hyperalgesia in rats: prolonged effect related to COX-2 expression impairment. *Pain*. 2008;140:274-283.
19. Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*. 1987;328:632-634.

20. Gao YJ, Ji RR. c-Fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury? *Open Pain J.* 2009;2:11-17.

Legend of figures

Figure 1. Injection sites of carrageenan in the abdominal wall. Carrageenan or saline was injected at a point 1/3 from midline on the bisector of the angle formed by the intersection between the line joining the 2 anterior superior iliac crests (horizontal line) and the linea Alba.

Figure 2. a- Nerves (large clear arrows) emerging from the spine (large solid arrow). Nerves pass under the paravertebral muscles (thin solid arrows) before entering the abdominal wall between parietal muscles.

b- Blue dots show proposed injection location for parietal abdominal nerve block injection.

c- Nerves infiltrated with indigo carmine dye (large clear arrows). Solid arrows show the paravertebral muscles.

Figure 3. a- Mechanical pain threshold in the two groups after parietal nerve block. The bupivacaine group shows a significant increase in threshold as compared to placebo group. Box plots are median, 10th, 25th, 75th and 90th percentile, dots are lower and upper range. * $p=0.007$ vs. control.

b- Number of c-Fos immunoreactive nuclei in the spinal cord measured at different metameric levels (8 rats/group). c-Fos reactive nuclei were significantly less numerous in the bupivacaine group than in the control group from T5 to L3. * $p<0.0001$ bupivacaine group vs. control group.

Figure 1
[Click here to download Figure: figure1.tif](#)

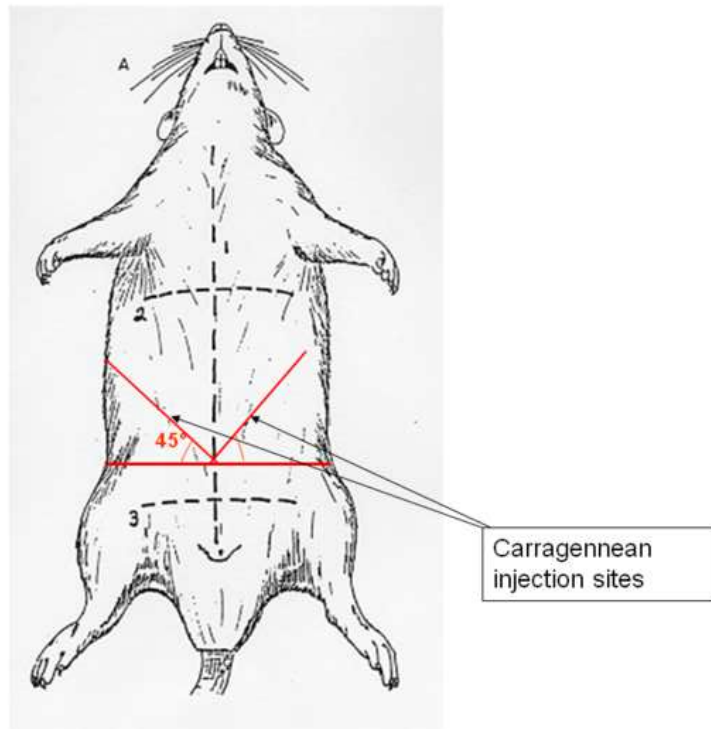


Figure 2
[Click here to download Figure: Figure 2.tif](#)

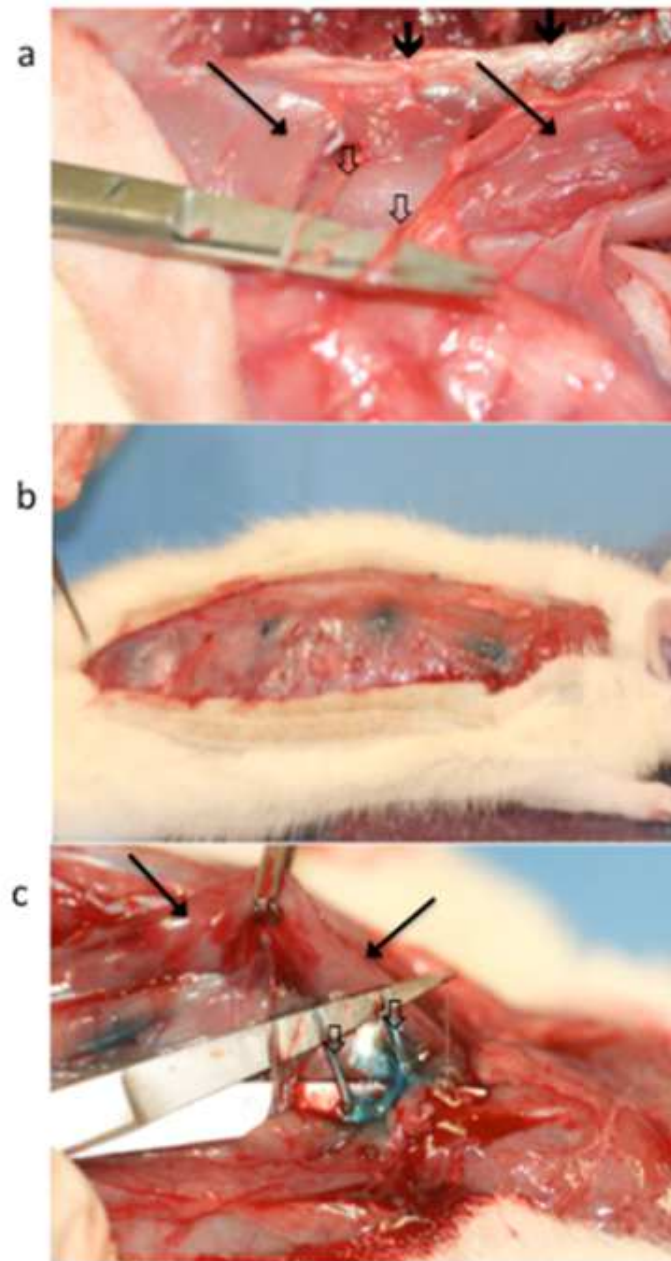
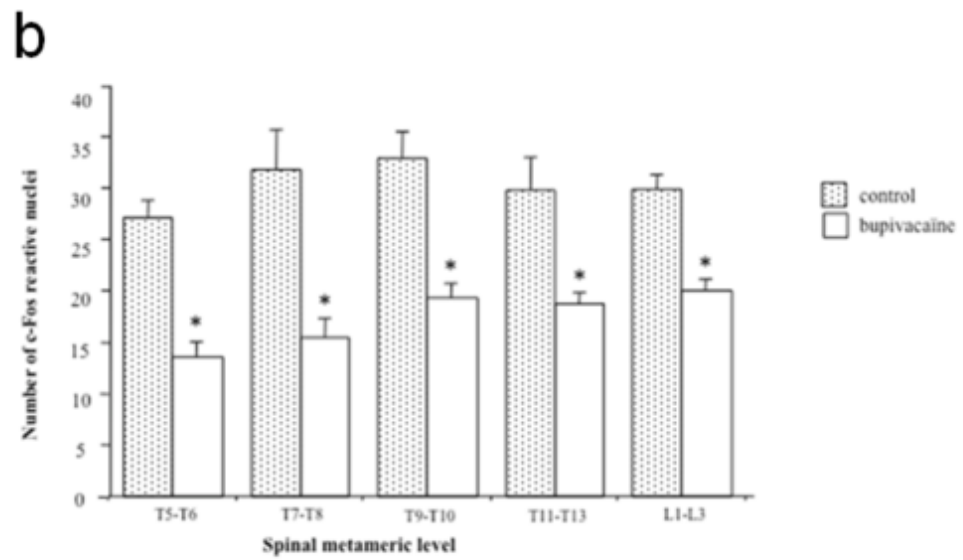
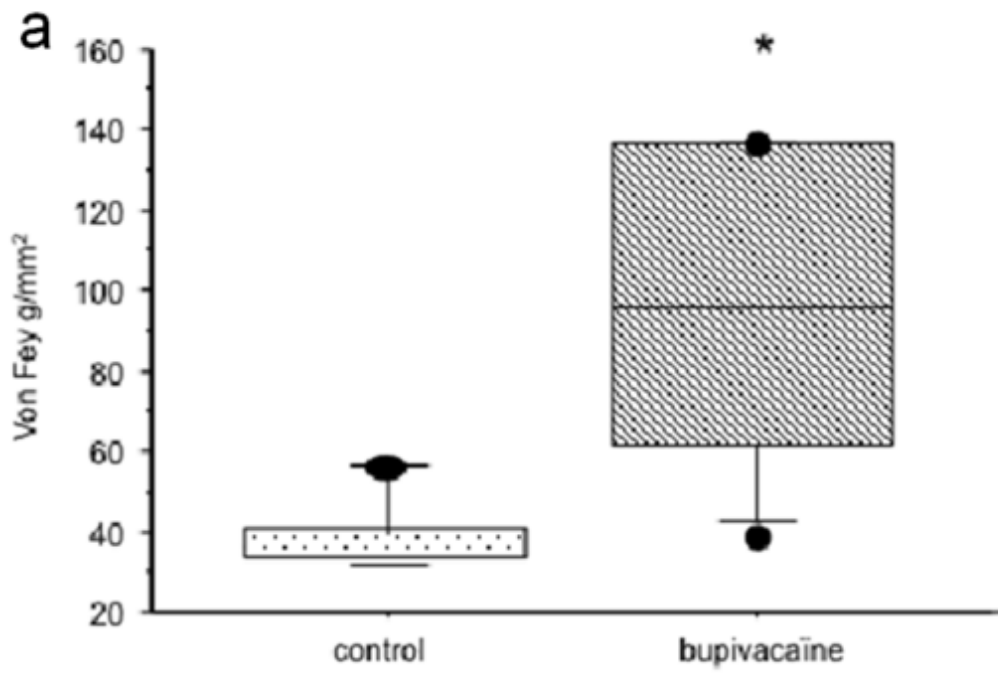


Figure 3
Click here to download Figure: Figure 3.tif



RESUME

La douleur abdominale post chirurgicale présente 2 composantes : (1) une composante pariétale liée à l'agression des muscles de la paroi abdominale et du péritoine pariétal et (2) une composante viscérale liée à l'agression du péritoine et des viscères. La douleur pariétale est bien systématisée, elle correspond à des métamères bien identifiés. A l'inverse, la douleur viscérale est souvent mal localisée. La différence entre les deux composantes de la douleur réside essentiellement dans l'innervation de la paroi abdominale et des viscères. Ainsi, la peau, les muscles de la paroi abdominale et le péritoine pariétal distribuent leurs afférences vers les racines nerveuses dorsales de la moelle épinière tandis que le péritoine viscéral et les viscères sont innervés par le nerf vague et par la moelle épinière à travers le système nerveux sympathique.

Les anesthésiques locaux administrés par l'intermédiaire d'un cathéter d'infiltration pariétal, d'un bloc de la paroi abdominale ou par voie systémique montrent une efficacité clinique dans l'analgésie post opératoire d'une chirurgie abdominale. Cependant, le mécanisme d'action des anesthésiques locaux en fonction de la voie d'administration n'est pas bien élucidé. Le but de nos études est d'explorer l'effet des anesthésiques locaux sur les deux composantes de la douleur abdominale dans un modèle animal en fonction de la voie d'administration.

Dans ce but, nous avons réalisé 3 études expérimentales :

1- Dans l'étude 1, nous avons comparé l'effet de la ropivacaïne administrée par voie systémique ou par un cathéter pré péritonéal sur la douleur pariétale et viscérale dans un modèle de laparotomie chirurgicale chez le rat. La douleur a été évaluée par une étude comportementale. Nous avons également étudié l'inflammation par un dosage des cytokines (IL-1 β et TNF- α) dans le sang et dans la cavité péritonéale.

2- Dans l'étude 2, nous avons mis au point un bloc de la paroi abdominale chez le rat. L'inflammation pariétale abdominale est induite par l'injection de la carragénine dans la paroi abdominale. Un bloc de la paroi abdominale est réalisé avec de la bupivacaïne. L'efficacité de ce bloc est évaluée par une étude comportementale et l'analyse de l'expression de c-Fos dans la moelle épinière par immunohistochimie.

3- Dans l'étude 3, l'inflammation pariétale et péritonéale est induite par injection de la carragénine dans la paroi abdominale ou dans la cavité péritonéale chez le rat selon le groupe expérimental. Nous avons ensuite comparé l'effet de la bupivacaïne par voie systémique à l'effet obtenu par l'administration de la bupivacaïne par un bloc de la paroi abdominale. De plus, l'effet des anesthésiques locaux par voie systémique a été comparé à une vagotomie chimique préventive. L'expression de c-Fos et de TNF- α dans la moelle épinière et le tronc cérébral a été mesurée dans le but de comparer l'efficacité des différentes techniques utilisées.

L'ensemble de ces travaux montre que lors d'une laparotomie, les anesthésiques locaux sont efficaces dans le traitement de la nociception aussi bien par voie systémique que par voie locorégionale. Nous avons démontré qu'un bloc de la paroi abdominale ainsi qu'une infiltration pré péritonéale diminuaient la transmission de la nociception viscérale vers le SNC par action directe sur les terminaisons nerveuses pariétales. De plus, lors d'une laparotomie, l'administration systémique d'anesthésiques locaux entraîne une efficacité dans l'inhibition de la transmission de la nociception viscérale vers le système nerveux central associée à un effet anti inflammatoire local et systémique supérieur à celui d'une administration locorégionale.

Des travaux complémentaires seront réalisés afin d'explorer (1) l'action des anesthésiques locaux sur les différentes cellules impliquées dans la douleur viscérale dont les neurones, les cellules microgliales et les astrocytes, ainsi que (2) les interactions existantes entre ces différentes cellules.

Mots clés : Anesthésiques locaux, douleur viscérale, cathéter pré péritonéal, bloc de la paroi abdominale, nerf vague.