



HAL
open science

Etude des voies d'activation de la douleur viscérale aigue dans le système nerveux central: Interaction astrocyte-Microglie

Mouna Ben Rehouma

► To cite this version:

Mouna Ben Rehouma. Etude des voies d'activation de la douleur viscérale aigue dans le système nerveux central: Interaction astrocyte-Microglie. Neurosciences. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT: 2022UPASL050 . tel-04713045

HAL Id: tel-04713045

<https://theses.hal.science/tel-04713045v1>

Submitted on 28 Sep 2024

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.

Intégration du message douloureux viscéral
aigu au niveau du Système Nerveux Central :
Interaction astrocytes-microglie

*Integration of the acute visceral pain message in the Central Nervous
System: astrocyte-microglia interaction*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 568, Signalisations et réseaux intégratifs en Biologie (BIOSIGNE)
Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé
Graduate School : Life Science and Health. Référent : Faculté de médecine

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Maladies et hormones du système
nerveux** (Université Paris-Saclay,INSERM), sous la direction de **Dan Benhamou**, PUPH

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 12 septembre 2022, par

Mouna BEN-REHOUMA

Composition du Jury

Dominique Fletcher PUPH, INSERM Université Paris- Saclay	Président
Hawa Keita Meyer PUPH, INSERM Université de Paris	Rapporteuse & Examinatrice
Jean Marc Sabaté PUPH, INSERM Université Sorbonne Paris-Nord	Rapporteur & Examineur
Marc Beaussier Pr, Institut Mutualiste Montsouris	Examineur
Jean Pascal Lefaucheur PUPH, INSERM Université Paris Est Créteil	Examineur
Dan Benhamou PUPH, INSERM Université Paris- Saclay	Directeur de thèse

Remerciements :

Je souhaite remercier Monsieur Benhamou pour m'avoir supervisé pendant ces quatre ans. Merci de votre aide et de votre disponibilité ainsi que de votre bienveillance. Vous avez toujours réussi à vous rendre disponible pour pouvoir discuter des travaux, mais aussi de l'écriture. J'ai été très heureuse d'être votre étudiante en thèse. Merci encore.

Je souhaite remercier Mr Montravers, mon chef de service. Merci de m'avoir permis de réaliser ce travail, merci de m'avoir accordé du temps pendant quatre ans malgré les difficultés du quotidien. Cela fait près de 10 ans que je travaille à Bichat et je suis toujours aussi heureuse de venir y travailler.

Je souhaite remercier Monsieur Mazoit, de m'avoir aidé et apporté son expertise à chaque étape de réalisation du projet, notamment dans le domaine des statistiques. Vos connaissances sont précieuses et merci d'avoir pris le temps pour toutes ces explications.

Je souhaite remercier Leila Hamdi pour son aide au quotidien pendant toute la durée du projet, de tout le soutien aussi qu'elle m'a apporté. Je n'aurai jamais pu finir tous les travaux sans ton aide. Merci.

Je souhaite aussi remercier Madame Martinez, qui a bien voulu participer au comité de suivi. Merci de votre aide et de vos précieux conseils.

Je souhaite remercier l'ensemble des membres du jury : Mme Keita Meyer, Mr Fletcher, Mr Sabaté, Mr Beaussier et Mr Lefaucheur de me faire l'honneur d'être membre de mon jury. Merci d'apporter votre expertise à ce travail et vos conseils.

Merci à Larbi Amazit, pour avoir pris le temps de nous aider et de nous avoir apporter ton expertise pour l'imagerie pendant ces quatre ans.

Enfin, je remercie les trois hommes qui partagent ma vie et qui ont eu la patience de me soutenir pendant toute la durée de ce travail : Sami, Noa et Mylan.

Table des matières :

I) Introduction :	7
A) Douleur viscérale et voies de transmission :	9
1) Définition de la douleur viscérale :	9
2) Voies de transmission de la douleur viscérale :	11
<i>a) le nerf vague :</i>	<i>11</i>
<i>b) les afférences médullaires :</i>	<i>13</i>
B) Cellules microgliales et astrocytaires dans le système nerveux central	16
1) Rôle de la microglie et des astrocytes dans le SNC	16
<i>a) La microglie</i>	<i>16</i>
<i>b) Les astrocytes :</i>	<i>19</i>
2) Rôle des cellules gliales dans la douleur :	21
<i>a) Généralités :</i>	<i>21</i>
<i>b) Spécificités de l'activation astrocytaire et microgliale dans la douleur viscérale</i>	<i>27</i>
C) Descriptif des techniques de laboratoire utilisées	29
1) Le modèle de péritonite chimique :	29
2) Immunohistochimie et Immunofluorescence :	29
<i>a) Etude immunohistochimique</i>	<i>29</i>
<i>b) Etude avec immunofluorescence</i>	<i>31</i>
II) Article 1: Acute Visceral Pain in Rats: Vagal Nerve Block Compared to Bupivacaine Administered Intramuscularly.	33
A) Présentation de l'article :	33
B) Article 1	34
C) Discussion des résultats de l'article	69

III°) Article 2 : Activation of glial cells, production of TNF-alpha and interaction between microglia and astrocytes cells in a model of acute visceral pain in rats	71
A) Présentation de l'article :	71
B) Article 2	72
C) Discussion des résultats de l'article	93
IV)Discussion générale et perspectives :	94
V) Conclusion :	104
VI) Bibliographie :	105

Liste des figures :

Figure 1 : Classification de la douleur par son mécanisme (Woolf, 2010)

Figure 2 : Anatomie et trajet du nerf vague (Berthoud et al, 2000)

Figure 3 : innervation viscérale : terminaison médullaire (Sadeghi et al, 2018).

Figure 4 : Innervation médullaire au niveau du tube digestif (Brookes et al, 2013).

Figure 5 : Transmission du message douloureux au niveau médullaire (Vermeulen et al, 2014).

Figure 6 : Trajet de la douleur viscérale (Gebhart, 2016)

Figure 7 : Modification morphologique des cellules microgliales (Karperien, 2013)

Figure 8 : Phagocytose des neurones par les cellules microgliales (Brown, 2014).

Figure 9 : Modification activité astrocytaire en cas d'agression (Sofroniew, 2010)

Figure 10 : activation du récepteur P2X4 des cellules microgliales dans la douleur neuropathique (Salter, 2017).

Figure 11 : Interaction astrocyte-microglie-neurone dans un modèle de douleur neuropathique (Ren, 2010)

Figure 12 : Interaction astrocyte-microglie-neurone dans la douleur neuropathique (Ji, 2013)

Figure 13 : Cellules gliales entériques et transmission de la douleur viscérale (Morales-Soto, 2019).

Figure 14 : Techniques d'immunohistochimie indirecte (schéma tiré de l'institut universitaire de cancer de Toulouse)

Figure 15 : Techniques d'immunofluorescence (Odell et Cook 2013).

Liste des tableaux:

Tableau 1: Modification de l'activité des chémorécepteurs et des transporteurs membranaires dans la douleur neuropathique

Tableau 2: Modification de l'activité des chémorécepteurs et des transporteurs membranaires dans la douleur inflammatoire

Tableau 3: Modification de la synthèse des cytokines, chémokines, facteurs de croissance et des protéases dans la microglie et les astrocytes dans la douleur neuropathique

Tableau 4: Modification de la synthèse des cytokines, chémokines, facteurs de croissance et des protéases dans la microglie et les astrocytes dans la douleur inflammatoire

Tableau 5: Etat des connaissances actuelles, apports du travail de thèse et travaux envisagés.

Abréviations :

BDNF : Brain Derived Neurotrophic Factor

CD11b : Cluster of Differentiation 11b

ERK : Extracellular signal Regulated Kinase

GCSF : Granulocyte Colony Stimulating Factor

GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein

GLT1 : Glutamate Transporter 1

GlyT1 : Glycine Transporter 1

IASP : International Association for the Study of Pain

IBA1: Ionized-calcium Binding protein1

IL1 β : Interleukin 1 β

LPS : Lipopolysaccharide

MAP kinase: Mitogen Activated Protein kinase

MICI : Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin

NF κ B: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NTS : Noyau du Tractus Solitaire

P-ERK : Phosphorylated Extracellular signal-Regulated Kinase

SFETD : Société Française d'Etude et de Traitement de la Douleur

SNC : Système Nerveux Central

TNF-alpha : Tumor Necrosis Factor alpha

TRPV1 : Transient Receptor Potential cation channel subfamily V member 1

I) Introduction :

La douleur viscérale est un véritable problème de santé publique. Qu'elle soit aiguë ou chronique, la douleur abdominale représente plus de 11 millions de motifs de consultation aux Urgences en 2010 aux Etats-Unis (Gebhart et Bielefeldt 2016) et entraîne plus d'un million d'hospitalisations par an aux Etats-Unis à la même période. De plus, la douleur abdominale chronique représente plus d'un tiers des douleurs chroniques (Gebhart et al, 2016), avec une prévalence de 2 à 4 % chez les enfants et de 1,7 % chez les adultes aux Etats-Unis (Patrizi et al. 2006). Cette prévalence est considérablement augmentée chez les patients souffrant de maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI) telle que la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique au cours desquelles elle atteint près de 25% des malades.

Hormis l'impact économique certain, cette pathologie engendre des répercussions dans la vie quotidienne des malades avec :

- une augmentation de l'absentéisme scolaire (Assa et al. 2015)
- une diminution de la qualité de vie
- une prévalence plus importante de syndrome dépressif, notamment chez les patients souffrant de douleur abdominale chronique

Cette problématique est d'autant plus importante que les traitements sont pour la plupart inefficaces, motivant le recours de plus en plus fréquent aux opioïdes. Les prescriptions d'opioïdes ou de l'un de leurs dérivés a engendré au cours des deux dernières décennies aux Etats-Unis une véritable crise de santé publique avec une augmentation exponentielle du nombre de personnes dépendantes et du nombre de décès associés (Bohnert et Ilgen 2019). Cette crise nord-américaine a permis d'ouvrir les yeux du monde médical sur la surconsommation d'opioïdes et a permis d'augmenter le recours à d'autres alternatives. Cette donnée est également vraie en postopératoire, où la morphine a longtemps été le médicament de référence, motivant notamment le papier de Colvin et al (Colvin, Bull, et Hales 2019) ayant pour titre : "Perioperative opioid analgesia, when is enough too much.". Les auteurs expliquent de manière précise dans cet article les mécanismes responsables de l'hyperalgésie et de la tolérance liés à un mésusage des morphiniques et insistent sur l'intérêt de l'analgésie multimodale.

La problématique de l'absence d'efficacité des traitements dans la douleur viscérale provient du fait que la transmission du message douloureux est complexe avec plusieurs voies mises en jeu :

- le nerf vague qui véhicule le message douloureux jusqu'au noyau du tractus solitaire au niveau du tronc cérébral : ce sont les afférences vagales.
- les nerfs sensitifs remontant jusqu'à la moelle épinière par les ganglions paravertébraux : ce sont les afférences médullaires.

De plus depuis plusieurs années, il est apparu qu'au niveau cellulaire, et au-delà des voies neurophysiologiques classiques, l'intégration du message douloureux au niveau du système nerveux central (SNC) met en jeu deux types cellulaires dont le rôle dans ce domaine était encore méconnu : la microglie (cellule dérivée du macrophage responsable de l'homéostasie au niveau du SNC) et les astrocytes. Ces deux types cellulaires sont regroupés sous le terme général de cellules gliales.

Les premières études ayant mis en évidence leur rôle sont des études dans le champ de la douleur neuropathique ((Zhuang et al. 2005), (Robinson, Zhang, et Dougherty 2014), (Tsuda et al. 2004). Il semblerait que la transmission du message douloureux au niveau du SNC entraîne l'activation de la microglie et des astrocytes et que cette activation soit à l'origine de l'hyperinflammation secondaire et de la chronicisation de la douleur. Peu d'études existent sur le rôle de ces cellules dans la douleur viscérale. Néanmoins, certaines études ont montré dans un modèle animal d'inflammation colique une activation des cellules gliales au niveau du SNC (Saab et al. 2006) et aussi au niveau des ganglions paravertébraux (Hanani 2015), tandis que Sun et al (Sun et al. 2005) ont mis en évidence une activation astrocytaire au niveau médullaire après inflammation colique chez le rat.

Cependant les connaissances scientifiques portant sur ce domaine restent majoritairement imparfaites :

- microglie et astrocytes sont-ils systématiquement activés dans la douleur viscérale ?
- existe-t-il une cascade d'activation comme cela semblerait être le cas dans la douleur neuropathique, avec une activation microgliale première puis une activation astrocytaire secondaire ? (Grace et al, 2014)

-l'intégration du message douloureux viscéral est-elle la même que la douleur soit aiguë ou chronique ?

Des voies de signalisation complexes et multiples et le rôle probable mais non complètement élucidé de la microglie et des astrocytes expliquent en partie la difficulté de traitement de la douleur viscérale et l'absence de thérapeutique efficace. Néanmoins certaines pistes médicamenteuses ont vu le jour. En effet de nombreuses études cliniques ont mis en évidence l'efficacité des anesthésiques locaux en période postopératoire après chirurgie viscérale ((Beaussier et al. 2007); (Fusco et al. 2016)) conduisant à utiliser les anesthésiques locaux pendant et après les interventions de chirurgie abdominale. Néanmoins, leur mécanisme d'action est mal connu : Kfoury et al (Kfoury et al. 2011) ont mis en évidence dans un modèle de douleur viscérale aiguë chez le rat une diminution des taux sanguins de cytokines pro-inflammatoires après injection d'un anesthésique local (la ropivacaïne par voie intramusculaire) ainsi qu'une sensibilité significativement diminuée à la douleur par rapport aux groupes témoins. L'action des anesthésiques locaux reste encore peu claire dans ce modèle de douleur mais il existe une activité antiinflammatoire certaine.

D'autre part, plusieurs études se sont intéressées aux voies de signalisation intracellulaire et leur rôle dans la douleur. Ainsi dans la douleur neuropathique, plusieurs études ont mis en évidence la mise en jeu des MAP kinases et notamment de P38 dans l'intégration du message douloureux (Tsuda et al. 2004), aussi bien dans la douleur viscérale aiguë (Kondo et al. 2013) et dans la douleur viscérale chronique (Huang et al. 2019).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre projet de recherche. Nous souhaitons mieux appréhender les mécanismes neurophysiologiques de la douleur viscérale. Nous voulions étudier plus spécifiquement le rôle des cellules gliales et astrocytaires. Quelle est la cinétique d'activation de ces cellules ? Cette cinétique est-elle similaire à celle observée dans la douleur neuropathique ? Existe-t-il une interaction entre astrocytes et microglie ? Nous souhaitons aussi mieux comprendre le mécanisme d'action des anesthésiques locaux dans ce domaine.

A) Douleur viscérale et voies de transmission :

1) Définition de la douleur viscérale:

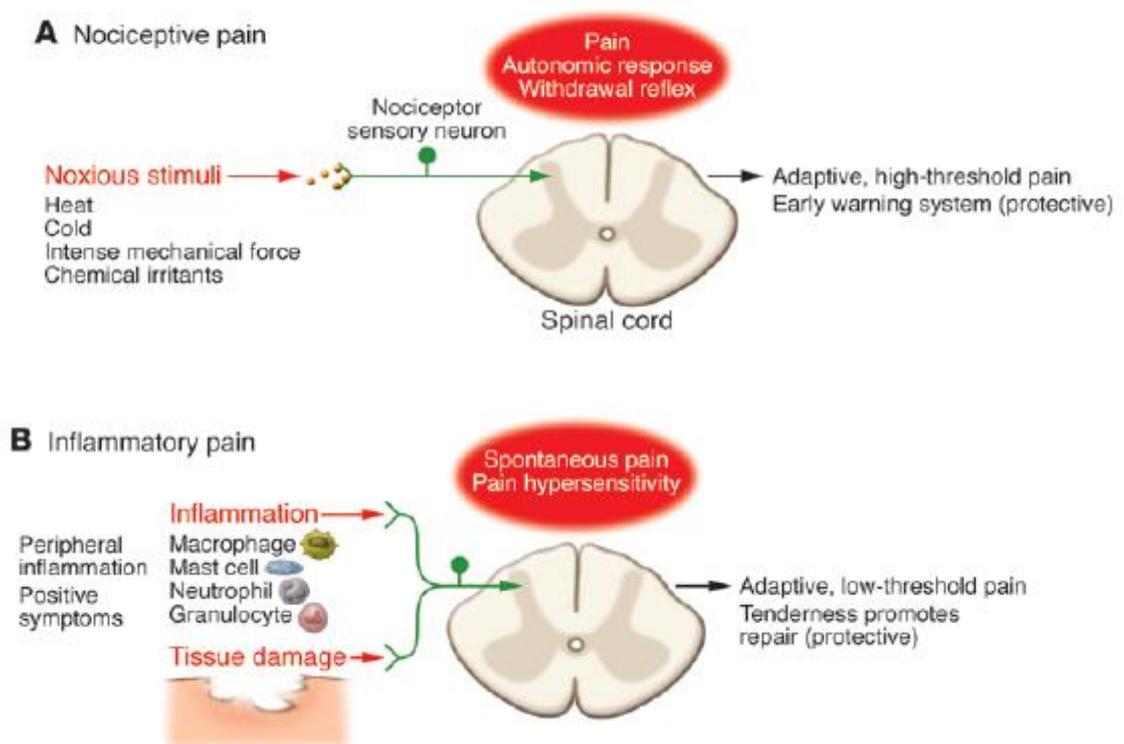
Selon l'IASP (International Association for the Study of Pain), la douleur est "une sensation ou une expérience émotionnelle désagréable en réponse à une atteinte tissulaire réelle ou potentielle ou décrites en ces termes". Woolf décrit alors 3 types de douleur (Woolf 2010) :

-la douleur dite "nociceptive" secondaire à un stimulus douloureux

-la douleur dite "inflammatoire" liée à un traumatisme tissulaire

-et la douleur dite "pathologique" qui n'est pas un symptôme et n'a pas de lien avec un problème organique.

Ces trois types de douleur sont résumés dans le schéma suivant. (Figure 1).



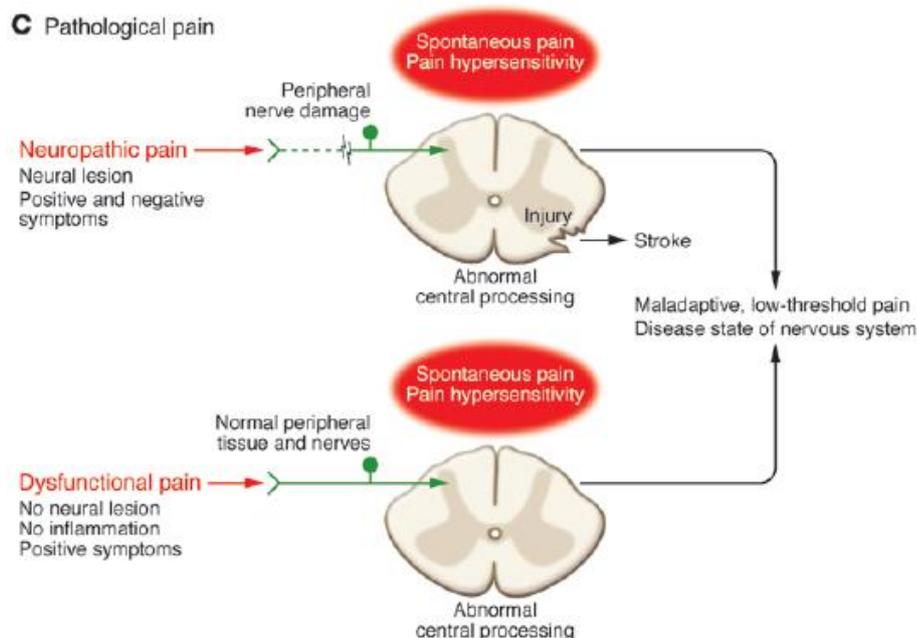


Figure 1 : Classification de la douleur par son mécanisme (Woolf et al, 2010)

On peut aussi classer la douleur selon qu'elle soit aiguë ou chronique. Selon la société française d'étude et de traitement de la douleur (SFETD) ; la douleur aiguë est "une atteinte tissulaire brutale" tandis que la douleur chronique est un "syndrome multidimensionnel présentant les caractéristiques suivantes : persistance ou récurrence qui dure au-delà de ce qui est habituel pour la cause initiale présumée, avec détérioration significative et progressive du fait de la douleur des capacités fonctionnelles et relationnelles du patient".

La douleur viscérale est liée à l'activation des nocicepteurs présents dans les viscères, dans leur périphérie immédiate ou dans les vaisseaux sanguins. Elle peut aussi être classée en fonction de son mécanisme selon les 3 catégories décrites par Woolf. Elle est responsable de nombreux types de douleur aiguë (exemple : pancréatite aiguë, colique hépatique, pyélonéphrite) mais elle est aussi pourvoyeuse de nombreuses douleurs chroniques (exemple : douleur abdominale dans les maladies inflammatoires et chroniques de l'intestin (MICI).

2) Voies de transmission de la douleur viscérale :

a) *le nerf vague* :

La principale voie d'innervation des viscères est le nerf vague. Le nerf vague présente une voie d'innervation afférente (allant des viscères jusqu'au tronc cérébral) et une voie

d'innervation efférente (allant du tronc cérébral et s'acheminant jusqu'aux viscères). Le nerf vague présente plusieurs particularités concernant ses fibres afférentes :

- le regroupement de ces cellules nerveuses en glomus appelés paraganglions aussi bien au niveau de sa branche thoracique qu'abdominale.

- sa projection au niveau cérébral se fait essentiellement au niveau du noyau du tractus solitaire, région située au niveau du tronc cérébral.

L'information est aussi transmise du tronc cérébral vers les viscères. Sur le plan anatomique, elle s'achemine à l'extérieur du crâne via le trou déchiré postérieur. Le nerf vague se divise très rapidement afin de donner plusieurs ramifications, les premières étant à destination de l'oreille moyenne et des méninges. Puis successivement au fur et à mesure de sa progression, des ramifications surgissent afin d'innerver les différents organes du corps humain. De nombreuses études anatomiques ont étudiées le trajet du nerf vague chez différents animaux. Ce trajet ainsi que ses différentes ramifications sont sensiblement les mêmes d'une espèce à l'autre (notamment du rat jusqu'à l'homme). Dans une revue de la littérature publiée en 2000, Berthoud et al reprennent l'anatomie du nerf vague ainsi que ses différentes innervations (Berthoud et Neuhuber 2000). (Figure 2).

Des études électrophysiologiques ont mis en évidence les différents rôles du nerf vague : chémorécepteur et mécanorécepteur (Blackshaw et Grundy 1989), thermorécepteur (El Ouazzani et Mei 1979) et osmorécepteur (Adachi 1984).

Son rôle dans la transmission de la nociception a été découvert plus tardivement dans les années 1990. Ainsi, il a fallu plusieurs études expérimentales animales pour le mettre en évidence. Traub et al (Traub, Sengupta, et Gebhart 1996) ont étudié l'expression de c-Fos (protéine produite rapidement dans les cellules après stimulus douloureux) au niveau du noyau du tractus solitaire au décours de plusieurs procédures chez le rat : distension gastrique, distension gastrique après vagotomie, distension gastrique après section médullaire au niveau T2. Les études d'immunohistochimie réalisées ont ainsi montré une expression de c-Fos au niveau du noyau du tractus solitaire après distension gastrique. Cette expression est significativement diminuée après vagotomie bien plus qu'après section médullaire.

Le nerf vague joue donc un rôle important dans la transmission du message douloureux viscéral, avec une projection au niveau du noyau de tractus solitaire qui paraît majeure.

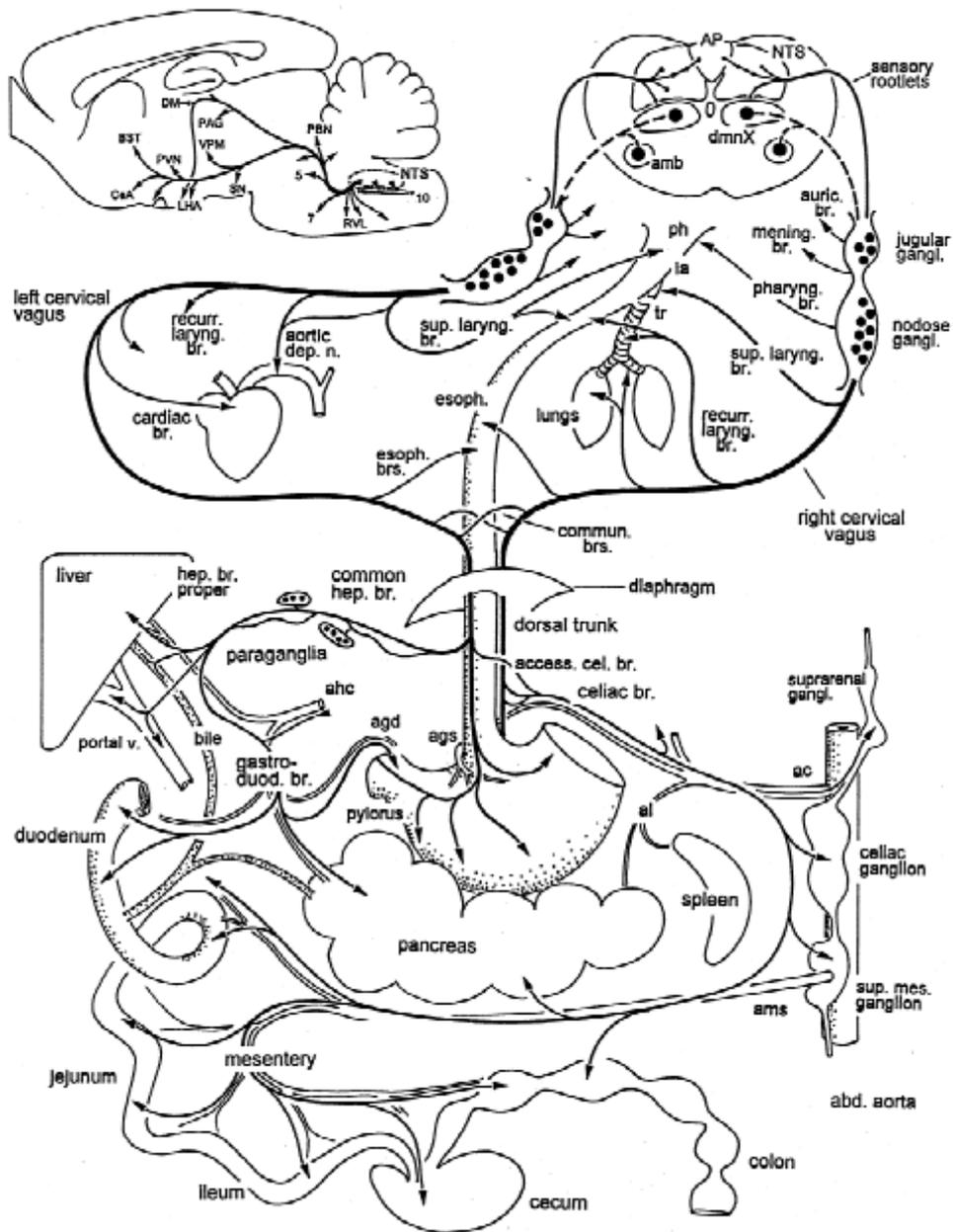


Figure 2 : Anatomie et trajet du nerf vague (Berthoud et al, 2000).

b) les afférences médullaires :

L'innervation médullaire viscérale est très riche. Elle présente de nombreuses afférences avec des terminaisons variées au niveau du même organe rendant la perception sensitive très fine. En effet au sein d'un même tissu, existent des afférences avec des terminaisons nerveuses au niveau de la séreuse, de la muqueuse, et de la musculuse comme schématisé dans la figure 3 (Sadeghi et al. 2018).

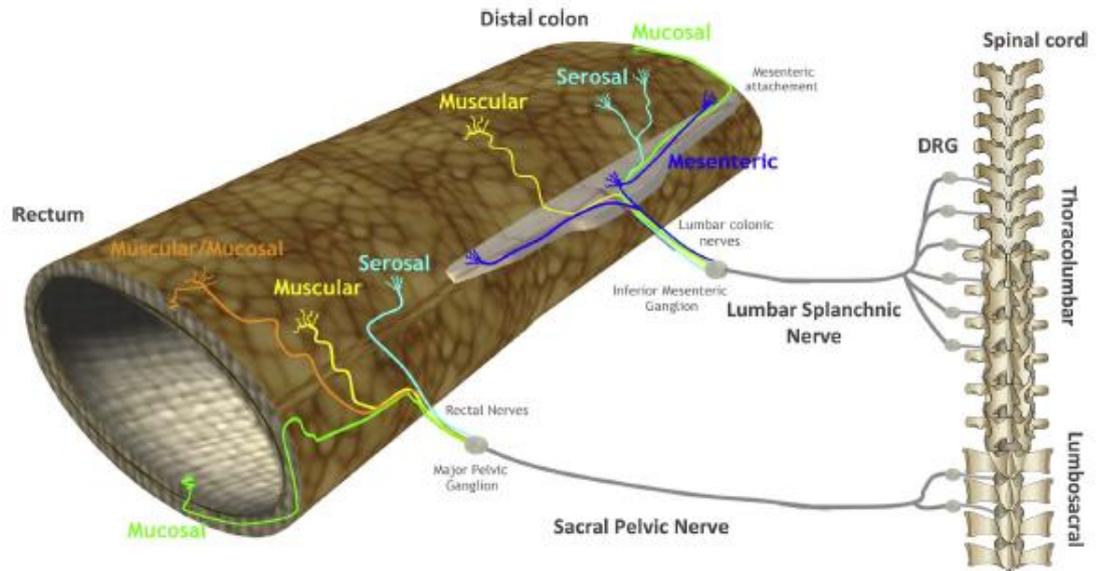


Figure 3 : innervation viscérale : terminaison médullaire (Sadeghi et al, 2018).

Cette richesse de l'innervation est aussi mise en relief au niveau du tube digestif par Brookes et al (Brookes et al. 2013) telle qu'elle est schématisée dans la figure 4.

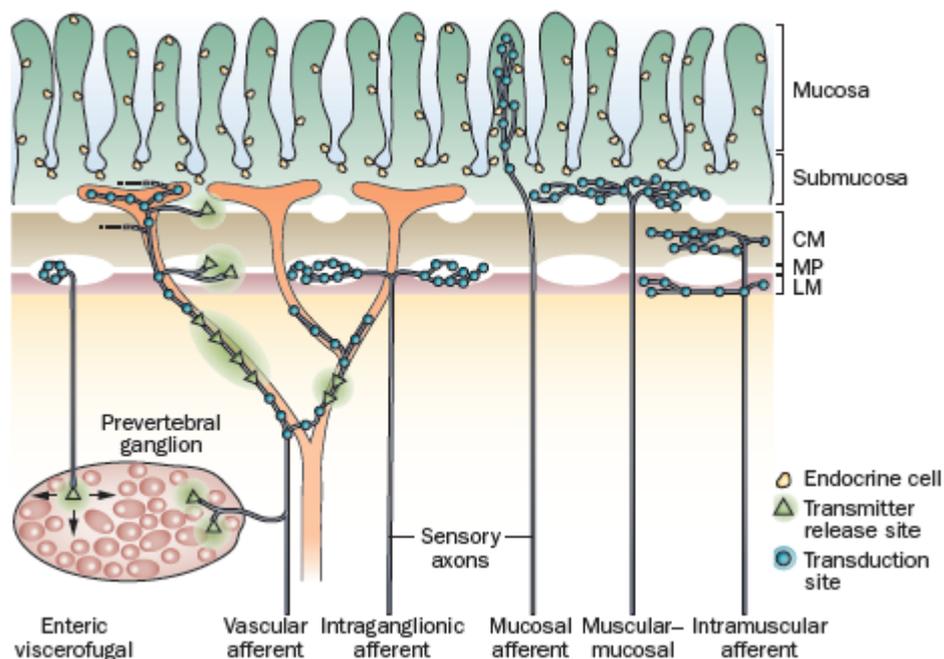


Figure 4 : Afférences en provenance du tube digestif (Brookes et al, 2013).

Abréviation: CM: circular muscle ; MP : myenteric plexus, LM : longitudinal muscle.

Les corps de ces différentes terminaisons se regroupent au sein des ganglions paravertébraux présents tout au long de la moelle épinière. Les fibres remontent via la

corne postérieure de la moelle épinière en passant de manière prédominante par les couches superficielles I et II de Rexed mais certaines fibres rejoignent des couches plus profondes de Rexed : la couche V et X. Secondairement, certaines de ces fibres décussent en rejoignant le quadrant antérolatéral controlatéral, tandis que d'autres ne décussent pas et forment le cordon postérieur. La douleur viscérale passe essentiellement par le cordon postérieur (Vermeulen et al. 2014). (cf : figure 5).

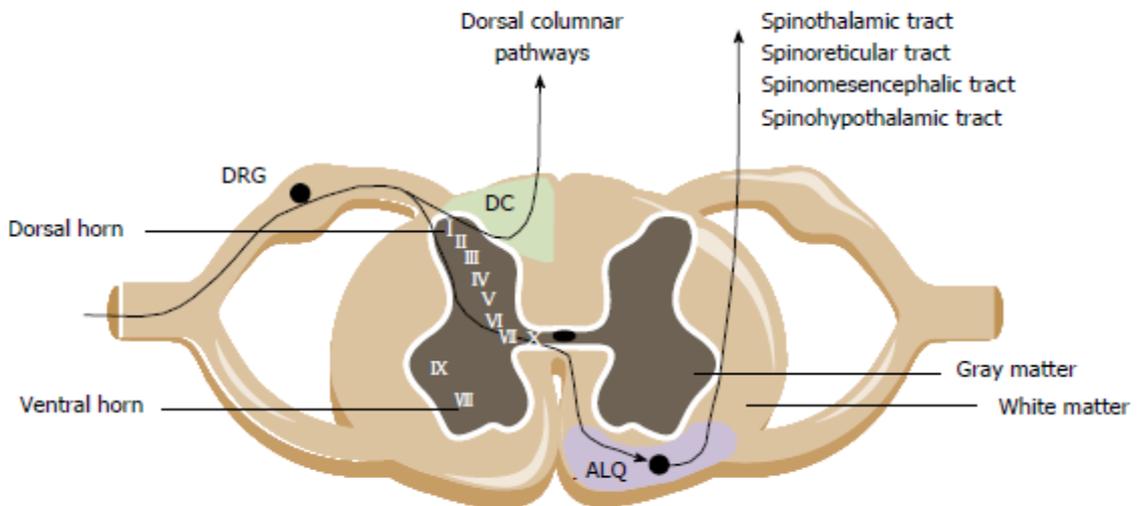


Figure 5 : Transmission du message douloureux viscéral au niveau médullaire (Vermeulen et al, 2014). DC : cordon postérieur ; ALQ : quadrant antérolatéral

Les fibres décussant pour rejoindre le quadrant antérolatéral controlatéral forment des faisceaux : le faisceau spinothalamique, le faisceau spinoréticulé, le faisceau spinomésencéphalique ainsi que le faisceau hypothalamique. Ces différents faisceaux ont pour terminaison essentiellement le thalamus, ainsi que le mésencéphale et contiennent donc des fibres sensibles de la nociception périphérique.

L'innervation viscérale est donc complexe avec des afférences très riches expliquant alors la complexité des mécanismes d'action mis en jeu et illustrés dans la figure ci-contre (Gebhart et Bielefeldt 2016). (cf : figure 6).

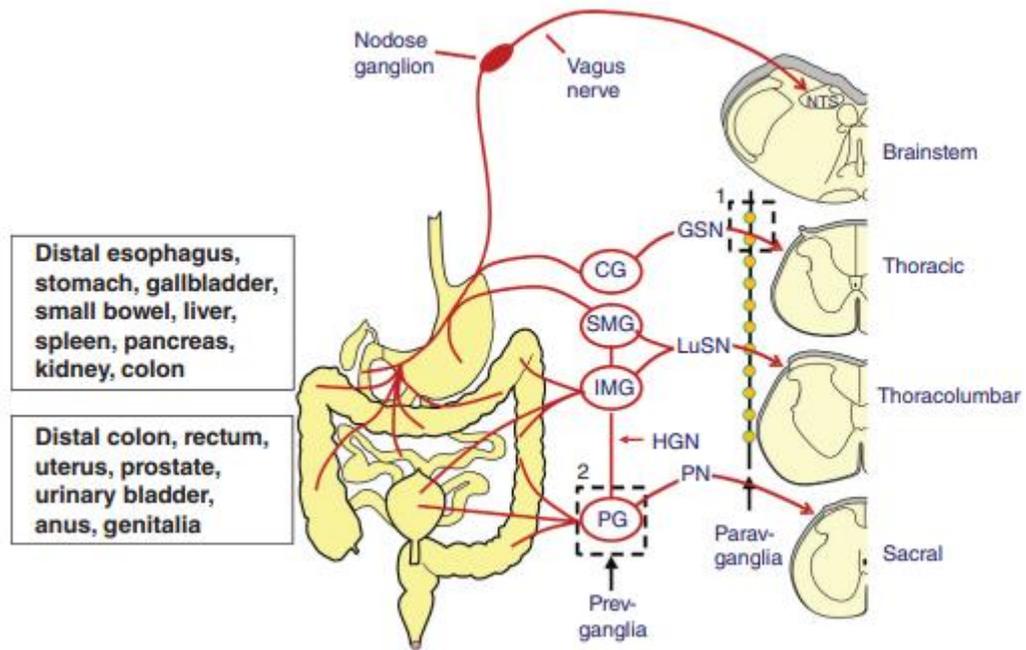


Figure 6 : Trajet de la douleur viscérale (Gebhart, 2016).

Abréviation : CG : ganglion coeliaque, SMG : ganglion mésentérique supérieur, IMG : ganglion mésentérique inférieur, PG : ganglion pelvien, GSN : grand nerf splanchnique, HGN : nerf hypogastrique, PN : nerf pelvien, LuSN : nerf splanchnique lombaire, NTS : noyau du tractus solitaire.

La complexité de l'innervation abdominale et notamment les deux voies parallèles (sur lesquelles il faut à priori agir en même temps) est un des éléments expliquant la difficulté rencontrée pour soulager les patients et trouver des thérapeutiques efficaces sur les douleurs viscérales aussi bien aiguës que chroniques.

B) Cellules microgliales et astrocytaires dans le système nerveux central

1° Rôle de la microglie et des astrocytes dans le SNC

a) La microglie

Les cellules microgliales sont les cellules parenchymateuses du SNC, d'origine myéloïde. Leurs précurseurs sont originaires du sac vitellin, ce qui les distingue des macrophages présents dans le reste de l'organisme (Salter et al, 2017). Différentes études ont permis de mettre en évidence les différentes fonctions des cellules microgliales dans le SNC. En premier lieu, elles surveillent l'homéostasie du SNC. En

effet plusieurs études ont montré une modification de leur motilité en réponse à la présence de neurotransmetteurs extra-membranaires (Abigea et al, 2016). Cette modification d'activité est aussi associée à une modification de morphologie, ainsi la microglie « quiescente » présente de multiples ramifications qui disparaissent lorsqu'elle est activée pour prendre une forme plus arrondie avec un grand corps cellulaire dite forme « activée » (Karperien et al, 2013). (cf : figure 7).

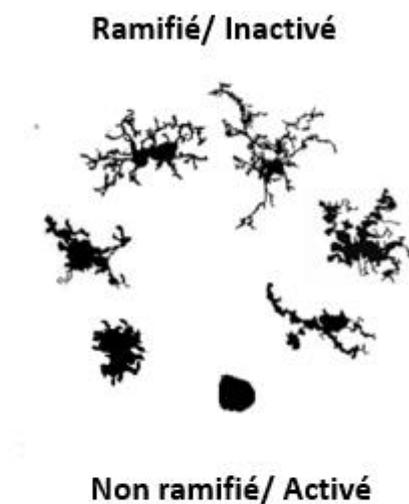


Figure 7 : Modification morphologique des cellules microgliales (Karperien, 2013).

Cette modification est aussi associée à une modification phénotypique entre la microglie « quiescente » de type M1 entraînant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par rapport à la microglie de type M2 dite « activée » synthétisant de manière plus importante des cytokines de type anti-inflammatoire (Hu et al, 2012 ; Xu et al, 2015 ; Yang et al, 2017). Les études sur la microglie ont été permises par les études d'immunohistochimie et en immunofluorescence par l'utilisation d'un marqueur membranaire appelée CD11b. L'expression de CD11b est en effet augmentée lors de l'activation microgliale.

Le rôle de la microglie dans le SNC a fait l'objet de nombreuses études au cours des dernières années mettant en évidence leur différentes fonctions.

En premier lieu, les cellules microgliales jouent un rôle important dans le développement des cellules neuronales immatures ; il a été démontré qu'elles influent sur le développement des synapses ou sur leur involution au cours du développement neuronal (Paolicelli et al, 2011). Elles sont présentes aux différentes étapes de la neurogénèse, en phagocytant les cellules neuronales « excédentaires » lors du développement cérébral puis en phagocytant les débris neuronaux résultant de l'apoptose de ces dernières (Brown et al, 2014). (cf. : figure 8).

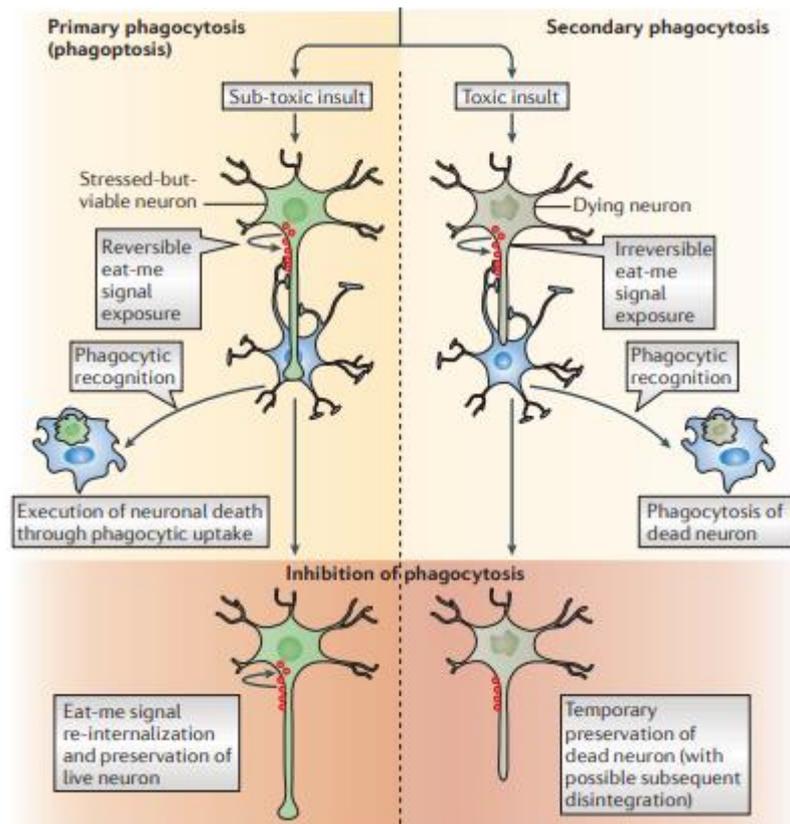


Figure 8 : Phagocytose des neurones par les cellules microgliales (Brown, 2014).

L'ensemble de ces éléments permet d'expliquer leur influence dans l'apparition de certaines pathologies du SNC. Ainsi Suzuki et al (Suzuki et al, 2013) ont montré une augmentation de l'activité des cellules microgliales chez les patients atteints de spectre autistique par rapport aux individus contrôles, tandis qu'une autre étude a mis en évidence des modifications de la transcription de gènes dans les cellules microgliales sur des tissus de cerveau de patients autistiques post mortem (Voineagu et al, 2011). La modification d'expression de certains gènes dans les cellules microgliales tel que TREM2 est aussi intimement liée à la maladie d'Alzheimer (Villegas-Llerena et al, 2016 ; Salter et al, 2017).

Les astrocytes :

Les astrocytes sont les autres cellules gliales du SNC. Tout comme les cellules microgliales, ils sont présents dans l'ensemble du système nerveux central, aussi bien dans la substance grise que dans la substance blanche. Chaque astrocyte présente 5 à 10 ramifications, chaque ramification présente de multiples prolongements. Des études d'immunofluorescence ont permis de mettre en évidence que chaque astrocyte est en contact avec plusieurs centaines de dendrites (Halassa et al, 2007) couvrant ainsi plusieurs centaines de milliers de synapses, tandis que grâce à la microscopie 3D, l'interaction et la communication étroite entre plusieurs astrocytes a été visualisée (Bushong et al, 2002).

Ces études d'immunohistochimie, d'électroscopie et d'immunofluorescence ont été permises grâce à l'étude de GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein). Cette protéine fait partie du cytosquelette des astrocytes. De nombreuses études ont permis de mettre en relief deux éléments liés à GFAP :

-il existe plusieurs isoformes de GFAP (alpha, beta, gamma, epsilon et kappa) (Andreiulo et al, 2009 ; Blechingberg et al, 2007).

-les astrocytes sous forme quiescente ne présentent pas tous une production détectable de GFAP, mais lors d'une agression ou d'une modification de l'homéostasie du SNC, les astrocytes activés présentent une augmentation de la synthèse de GFAP (Sofroniew et al 2010). (cf. : figure 9).

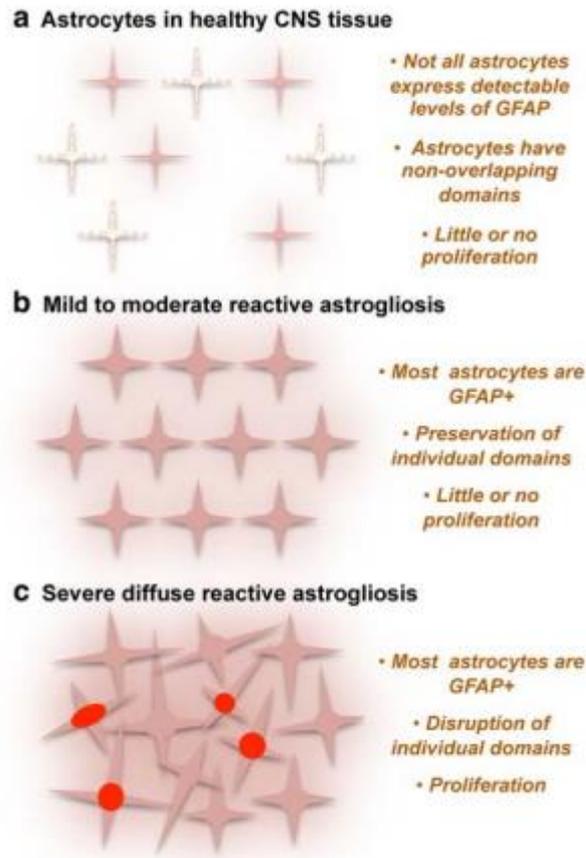


Figure 9 : Modification de l'activité astrocytaire en cas d'agression (Sofroniew, 2010)

Tout comme la microglie, les astrocytes ont un rôle essentiel dans le développement du SNC. Ils sont ainsi associés au développement des synapses par la sécrétion de thrombospondine (Christopherson et al, 2005). Ils régulent la transmission de l'influx et l'information entre les synapses par la libération extracellulaire de nombreux neurotransmetteurs et modifient le débit sanguin cérébral par la libération de molécules vasoactives (Sofroniew et al, 2009).

Plusieurs études ont rapporté (comme pour la microglie) un lien entre l'activité astrocytaire et certaines pathologies liées au SNC ; ainsi l'activité astrocytaire a été retrouvée augmentée dans la toxoplasmose cérébrale (Drögemüller et al. 2008), dans plusieurs formes d'épilepsie (Oberheim et al. 2008) et dans la maladie d'Alzheimer (Nagele et al. 2004).

Par conséquent, les cellules gliales (microglie et astrocytes) ont un rôle prépondérant dans le fonctionnement du SNC. La modification de leur activité a été intimement liée

à plusieurs pathologies affectant le SNC. C'est dans cette optique que plusieurs études se sont intéressées au lien entre douleur et cellules gliales.

2) Rôle des cellules gliales dans la douleur :

a) Généralités :

Plusieurs études ont montré l'activation astrocytaire et microgliale dans plusieurs modèles de douleur. Dans un modèle de douleur inflammatoire chez le rat (par injection d'adjuvant de Freund), il a été mis en évidence une augmentation de l'activité astrocytaire et microgliale (Zhang et Deng 2017). L'utilisation d'un inhibiteur aussi bien microglial (minocycline) qu'astrocytaire (ceftriaxone) a confirmé le lien existant entre transmission et intégration du message douloureux et les cellules gliales. En effet, l'injection intrathécale de minocycline diminue l'hyperalgésie dans un modèle expérimental d'injection intracolonne d'acide (Kannampalli et al. 2014). Une autre étude a mis en évidence que l'injection intrathécale de ceftriaxone augmente les seuils de douleur chez le rat lors de la réalisation d'une ligature nerveuse périphérique (Hu et al. 2010). Ces résultats ont été observés aussi bien dans la douleur aiguë que chronique. Ainsi une modification de l'activité des cellules gliales a été observée chez le rat aussi bien dans un modèle d'incision plantaire que dans un modèle de douleur chronique par section chirurgicale en L5 (Romero-Sandoval et al. 2008).

Différentes études se sont intéressées aux mécanismes mis en jeu lors de l'activation des cellules gliales au décours d'un stimulus douloureux. Ainsi dans un modèle de douleur nerveuse périphérique, une modulation de la synthèse de GLT1 sur la membrane des cellules astrocytaires a été mise en évidence (Ramos et al. 2010). La modulation de l'activité des récepteurs membranaires des cellules microgliales a été aussi étudiée. Inoue et al (Inoue 2008) ont mis en évidence l'activation du récepteur P2X4 dans un modèle de douleur neuropathique tandis qu'une modulation du récepteur P2X7 a été mise en évidence dans les cellules microgliales médullaires dans un modèle de pancréatite chronique chez le rat (P.-Y. Liu et al. 2015).

Ces modifications d'activation des cellules gliales ont une conséquence directe sur l'activité neuronale et donc sur l'intégration du message douloureux. Ainsi dans la douleur neuropathique, l'augmentation de l'activité du récepteur P2X4 sur les cellules microgliales est associée à une augmentation de la libération de BDNF qui entraîne une

hyperactivation des neurones ; ce mécanisme participerait à l'hyperalgésie dans la douleur neuropathique (Salter et Stevens 2017). (cf. : figure 10).

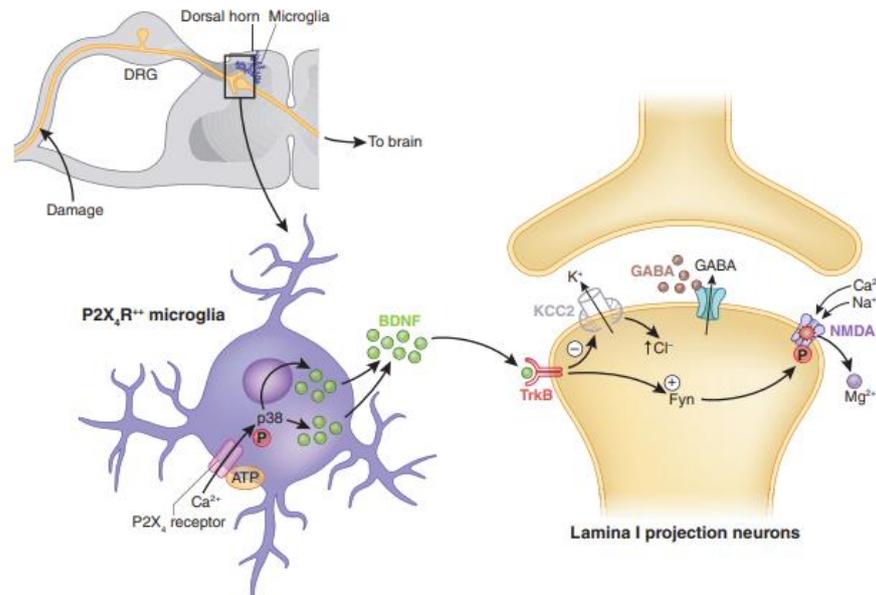


Figure 10 : activation du récepteur P2X4 des cellules microgliales dans la douleur neuropathique (Salter, 2017).

Dans la douleur neuropathique, il a aussi été montré que l'activation astrocytaire et microgliale entraîne la libération de TNF alpha modifiant l'activité et la plasticité des cellules neuronales (Y. Liu et al. 2017) (Beattie et al. 2002).

Ainsi la douleur entraîne une modification de l'activité des cellules gliales par augmentation de synthèse de chémorécepteurs, des récepteurs membranaires, ainsi que par la modification de la synthèse et de la libération extracellulaire de certaines molécules. L'ensemble de ces éléments ont été mis en évidence dans plusieurs études expérimentales chez l'animal dans différents types de douleur (Ji, Berta, et Nedergaard 2013) (Tableaux 1 - 4).

Tableau 1 : Modification de l'activité des chémorécepteurs et des transporteurs membranaires dans la douleur neuropathique

Douleur neuropathique	Microglie	Astrocytes
P2X4	+	=
P2X7	+	
P2Y6	+	
P2Y12	+	
TLR2	=	
TLR3	=	
TLR4	+	
CLq3,4,5	+	=
CX3CR1	+	=
CCR2	+	
IFN-γ R	+	
Cx43		+
Kir4.1	+	
TRPM2	=	=
GLT-1		-
GLAST		-
COX-1	+	
COX-2	+	
NF-Kb	+	
NOX-2	+	
STAT3	+	+
c-Jun		
CB2	+	+

Légendes : + : activité augmentée ; - : activité diminuée, = : pas de modification de l'activité

Tableau 2 : Modification de l'activité des chémorécepteurs et des transporteurs membranaires dans la douleur inflammatoire

Douleur inflammatoire	Microglie	Astrocytes
TLR3	=	
TLR4		+
Cx43		+
TRPM2	+	
GRK2	-	
ALX		-

Légendes : + : activité augmentée ; - : activité diminuée, = : pas de modification de l'activité

Tableau 3 : Modification de la synthèse des cytokines, chémokines, facteurs de croissance et des protéases dans la microglie et les astrocytes dans la douleur neuropathique

Douleur neuropathique	Microglie	Astrocytes
TNF-alpha	+	
IL-1β	+	+
IL-6	+	
IL-18	+	
CCL2		+
BDNF	+	
bFGF		+
MMP-2		+
Tpa		+
CatS	+	
TSP4		+

Légendes : + : libération augmentée ; - : libération diminuée, = : pas de modification

Tableau 4 : Modification de la synthèse des cytokines, chémokines, facteurs de croissance et des protéases dans la microglie et les astrocytes dans la douleur inflammatoire

Douleur inflammatoire	Microglie	Astrocytes
TNF-alpha	+	
IL1-β		+
IL-6	+	

Légendes : + : libération augmentée ; - : libération diminuée, = : pas de modification

Cette modification de l'activité des récepteurs membranaires et la libération des cytokines ont permis de déduire qu'il existe une modification de l'activité intracellulaire des cellules gliales. En effet, plusieurs études dans le cadre de la douleur neuropathique ont permis de mettre en évidence une modification de l'activité des MAP kinases notamment la phosphorylation de P38 (Tsuda et al. 2004) ; (Jin et al. 2003); (Kobayashi et al. 2008); (Piao et al. 2006) au niveau des cellules microgliales. Cette phosphorylation a aussi été démontrée dans les cellules microgliales dans un modèle de douleur inflammatoire (Svensson et al. 2003). Certaines études se sont intéressées aux astrocytes et ont mis en relief une modification de l'activité de P-ERK dans les cellules astrocytaires dans un modèle de douleur osseuse (Wang et al. 2012) et dans un modèle de douleur neuropathique (Zhuang et al. 2005).

Par conséquent, la stimulation douloureuse entraîne une activation des cellules astrocytaires et microgliales aboutissant à une modification de la synthèse de certaines molécules et des voies intracellulaires mises en jeu. Certains auteurs ont posé la question de savoir si cette modulation d'activité était parallèle ou s'il existait une interaction entre les astrocytes et la microglie.

Plusieurs études ont permis de confirmer qu'il existait bien une interaction entre la microglie et les astrocytes dans les processus douloureux. Cette interaction a essentiellement été mise en évidence dans la douleur neuropathique. L'hypothèse la plus admise est que la stimulation douloureuse de type neuropathique entraîne une activation microgliale qui entraînerait secondairement une activation astrocytaire et neuronale dans le même temps : les cellules interagiraient entre elles par l'intermédiaire de

différents médiateurs ; ce mécanisme est appelé « cross-talk » (Colburn et al. 1997) ; (Gao et al. 2009) ; (Raghavendra, Tanga, et DeLeo 2003) ; (Ren et Dubner 2010) ; (Ji, Berta, et Nedergaard 2013). Cette interaction est schématisée dans les figures suivantes. (cf. : figure 11, cf. : figure 12).

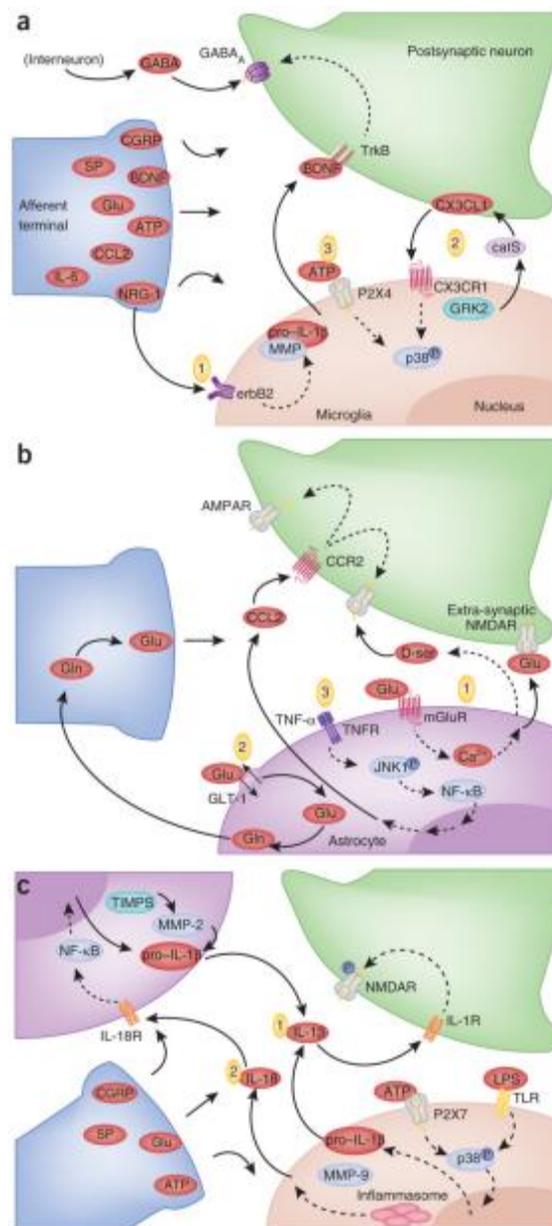


Figure 11 : Interaction astrocyte-microglie-neurone dans un modèle de douleur neuropathique (Ren, 2010)

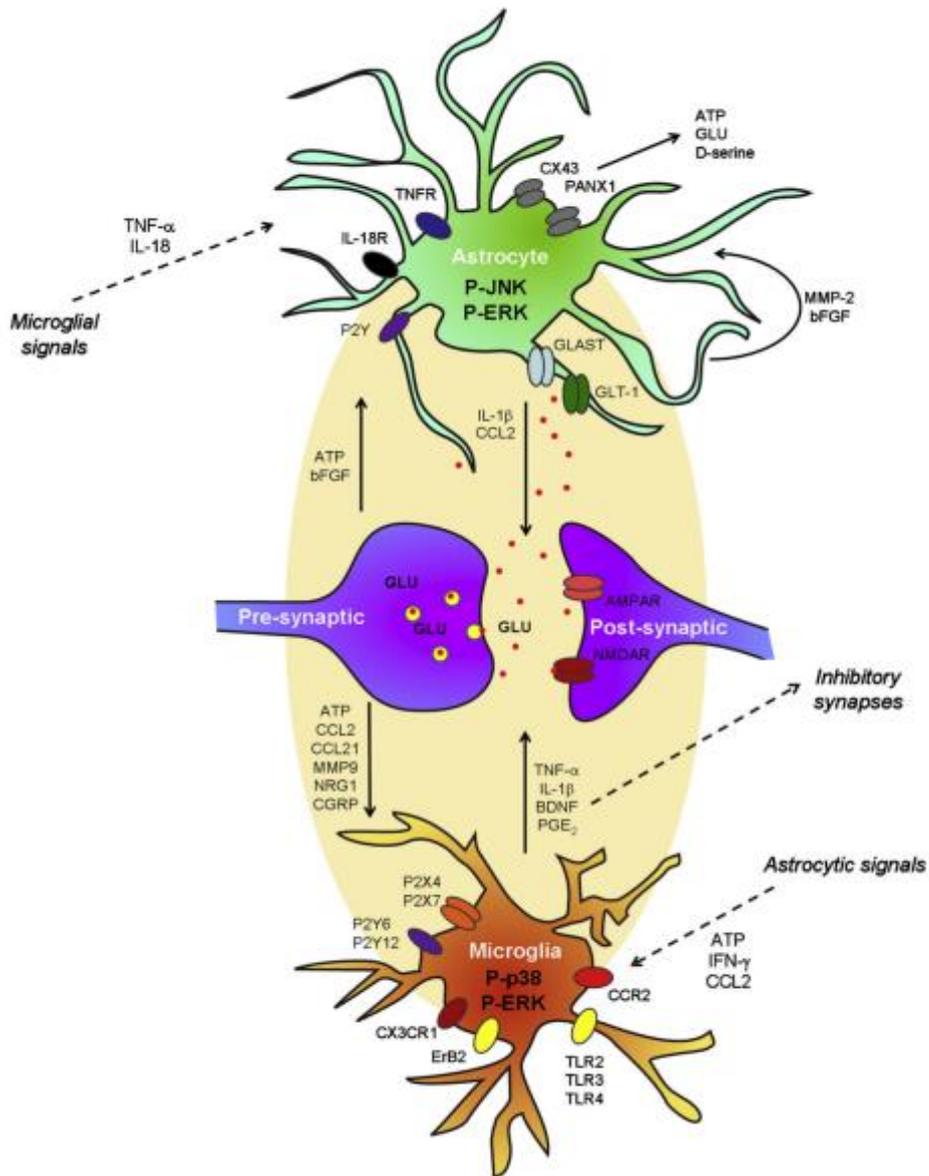


Figure 12 : Interaction astrocyte-microglie-neurone dans la douleur neuropathique (Ji, 2013).

L'activation astrocytaire et microgliale a fait l'objet de nombreuses études dans la douleur neuropathique ; néanmoins certaines études ont permis d'apporter quelques réponses plus spécifiques à la douleur viscérale que nous allons décrire ci-dessous.

b) Spécificités de l'activation astrocytaire et microgliale dans la douleur viscérale

L'activation astrocytaire et microgliale a aussi été mise en évidence dans des modèles de douleur viscérale. Ainsi dans un modèle de douleur viscérale

chronique chez le rat, il a été démontré une augmentation de l'activité microgliale au niveau médullaire et une élévation des seuils de douleur par injection de minocycline (inhibiteur de la microglie) (Saab et al. 2006). Dans un autre modèle de douleur chronique viscérale, il a été démontré une augmentation de l'activité astrocytaire (Sun et al. 2005).

Cette modification d'activité entraîne une modulation de la densité des récepteurs membranaires et de la libération de molécules dans le milieu extracellulaire. Par exemple, il a été démontré une augmentation du nombre des récepteurs P2X7 sur les cellules microgliales dans un modèle de pancréatite chronique chez le rat (P.-Y. Liu et al. 2015). Parallèlement, une autre étude a mis en évidence une augmentation du nombre de récepteurs microgliaux au G-CSF dans un modèle de douleur viscérale aiguë chez la souris (Basso et al. 2017). De façon similaire à ce qui est retrouvé dans la douleur neuropathique, certaines études s'intéressant à la douleur viscérale chronique ont montré une augmentation de l'activité des MAP kinases P38 au niveau microglial (Z. Chen et al. 2015), (P.-Y. Liu et al. 2012).

Certaines études ont permis de mettre en évidence une interaction entre les cellules gliales du SNC et d'autres cellules modifiant alors l'intégration du message douloureux. Ainsi l'activation des cellules de Schwann diminue l'activation astrocytaire et microgliale dans un modèle de pancréatite chronique (Demir et al. 2016). Il a aussi été mis en évidence le rôle des cellules gliales périphériques au niveau des ganglions paravertébraux dans la transmission du message douloureux viscéral (Hanani 2015). Depuis plusieurs années, les chercheurs s'intéressent de plus en plus au système nerveux « entérique ». Plusieurs études ont permis de mettre en évidence son implication dans plusieurs pathologies et depuis peu certaines études ont révélé le rôle des cellules gliales entériques dans la modulation du message douloureux mais les mécanismes mis en jeu restent encore très peu connus (Grubišić et al. 2020) ; (Grundmann et al. 2019) ; (Morales-Soto et Gulbransen 2019). Certaines voies de modulation ont été découvertes mais de nombreuses questions restent à élucider. (Cf. : figure 13).

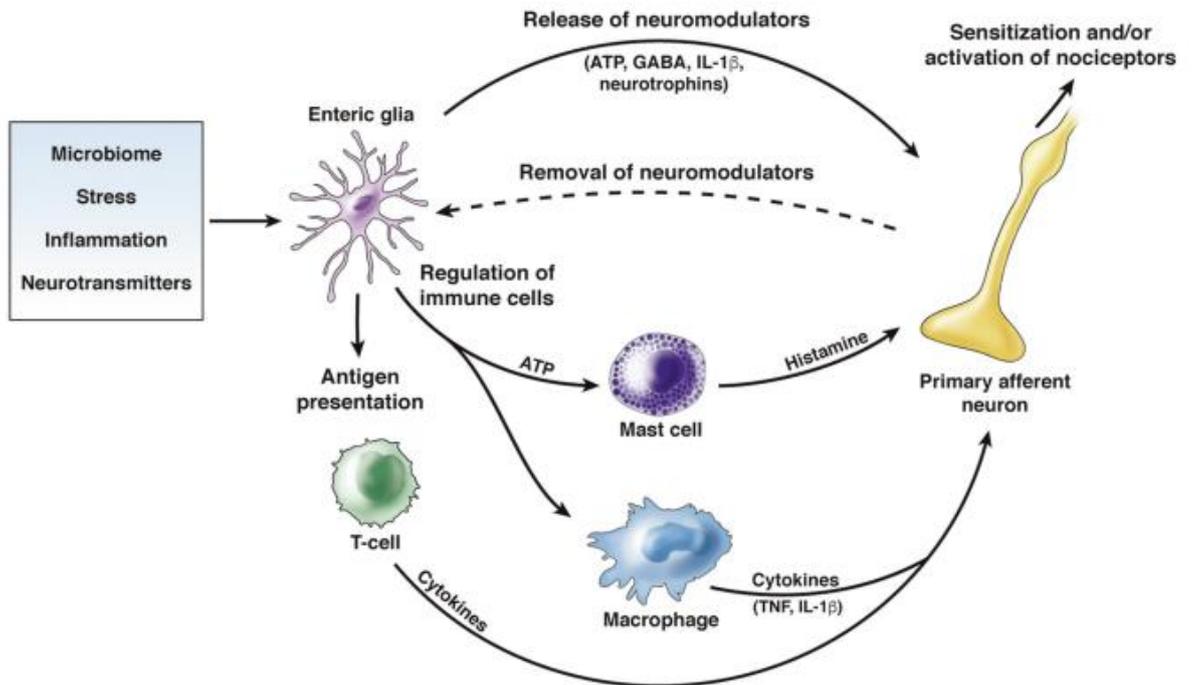


Figure 13 : Cellules gliales entériques et transmission de la douleur viscérale (Morales-Soto, 2019).

C) Descriptif des techniques de laboratoire utilisées :

1) Le modèle de péritonite chimique :

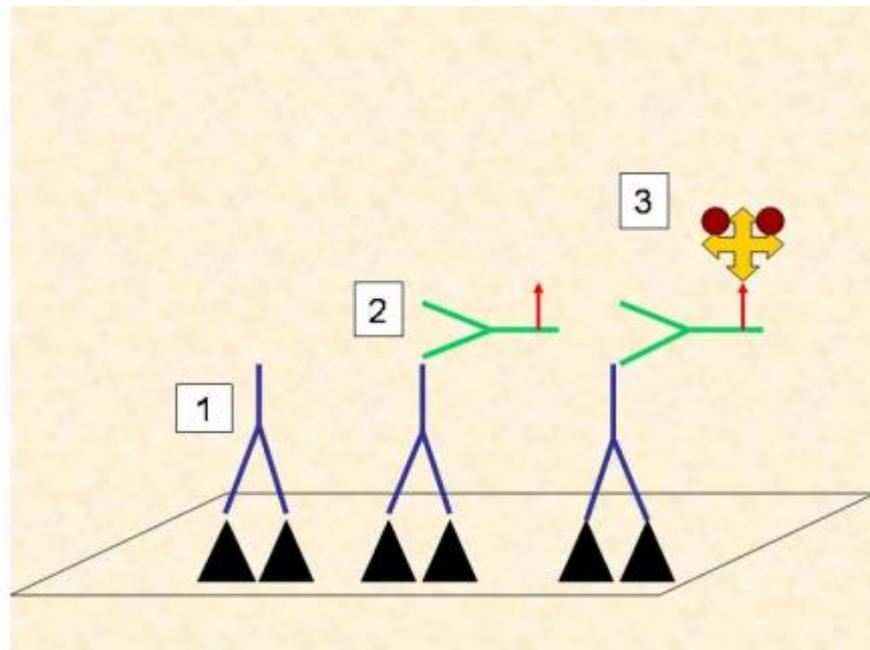
Le modèle de douleur viscérale aigue utilisé dans notre projet de recherche est un modèle de péritonite chimique chez le rat. Il s'agit de l'injection intrapéritonéale de carragénine. La carragénine est un polysaccharide soufré issue d'une algue rouge. Cette molécule est très régulièrement utilisée dans la littérature scientifique du fait de son action inflammatoire bien documentée dans différents types de modèles de douleur.

Ce modèle de douleur viscérale a été utilisée précédemment dans notre laboratoire et est donc bien maîtrisé par notre équipe (Kfoury et al. 2011). L'injection de carragénine 3% par voie péritonéale est réalisée sous anesthésie inhalatoire par isoflurane.

2) Immunohistochimie et Immunofluorescence :

a) Etude immunohistochimique :

La technique d'immunohistochimie permet la détection d'un antigène sur une coupe tissulaire grâce à un anticorps spécifique de cet antigène. La technique utilisée est dite d'immunohistochimie indirecte nécessitant un anticorps secondaire marqué réagissant avec l'anticorps primaire non marqué.



Streptavidine biotine peroxydase

- 1 Fixation anticorps primaire antigène
- 2 Fixation anticorps secondaire porteur d'une molécule de biotine
- 3 Fixation au complexe streptavidine peroxydase

Figure 14 : Techniques d'immunohistochimie indirecte (schéma tiré de l'Institut Universitaire du Cancer de Toulouse)

L'immunohistochimie est basée sur l'étude de l'anticorps anti c-Fos de lapin biotinylé (Millipore) avec comme anticorps secondaire un anticorps de chèvre anti anticorps de lapin conjugué HRP (Horse Radish Peroxydase) (Millipore). La technique utilisée est une technique de peroxydase avidine-biotine avec comme chromogène le di-amino-benzidine (DAB) et le nickel. Les lames sont dans un premier temps déparaffinées puis réhydratées dans des bains successifs d'éthanol à différentes concentrations. Les lames sont préchauffées pendant 20 minutes dans un tampon citrate à 10%. Le blocage des

peroxydases endogènes est réalisé par de l'eau oxygénée à 3% pendant 10 minutes tandis que le blocage des sites non spécifiques nécessite l'emploi de sérum de chèvre à 1% avec du Triton à 0,3% pendant trente minutes. Les lames sont incubées secondairement pendant 12H à +4°C avec l'anticorps primaire dilué au 1/500ème. Puis les lames sont incubées pendant une heure dans une solution contenant l'anticorps secondaire dilué au millième. La révélation est réalisée par oxydation de l'avidine-biotine (Vectastain Elite ABC PK-6100, Vector Laboratories) en diamino-benzidine. On obtient alors une coloration noire des noyaux. Enfin une contre-coloration à l'hématoxyline de Mayer au 1/50ème est réalisée. Les sections sont ensuite montées sur des lames de microscope SuperFrost plus adhérence + (Roth Laboratories) et recouvertes.

b) Etude avec immunofluorescence

La technique d'immunofluorescence est aussi basée sur la reconnaissance antigène-anticorps. Elle est dite d'immunofluorescence car l'anticorps secondaire est marqué avec un fluorochrome capable d'émettre de la lumière après excitation.

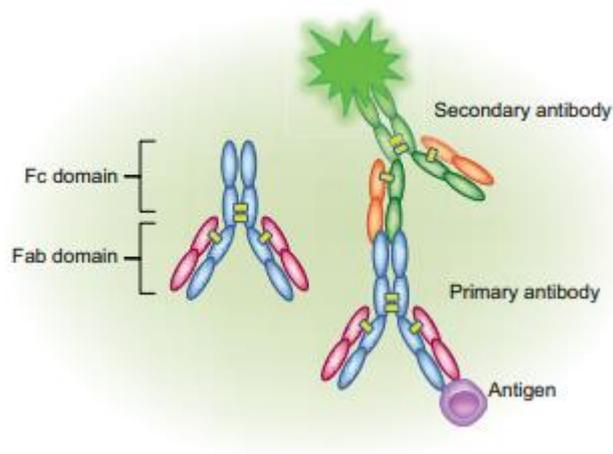


Figure 15 : Technique d'immunofluorescence (Odell et Cook 2013).

Abréviations ; Fab : antigen binding Fragment ; Fc :crystallizable Fragment .

La moelle épinière de T11 à T13 et le tronc cérébral sont prélevés et fixés dans le même fixateur pendant 12H. Des sections transversales de moelle épinière de 7- μ m et de tronc cérébral sont coupées et séchées pendant 48 heures. Après réhydratation, les sections sont lavées deux fois avec une solution tampon phosphate 0,15-M (PBS) et immergées dans de l'eau oxygénée (H₂O₂) à 2% pendant 30 minutes. Les sections sont incubées pendant 20 heures à 4 °C avec un anticorps monoclonal de souris contre CD11b/c (ab1211, Abcam) 1:100 ou un anticorps monoclonal de souris contre GFAP (AMAB91033, Sigma-Aldrich) 1:500 et un anticorps polyclonal de lapin contre TNF-alpha (ab66579, Abcam) 1:100. Les sections sont rincées dans du PBS (3 fois pendant 10 minutes chacune) et incubées avec des anticorps secondaires (anticorps de chèvre anti-lapin 1:1000 Alexa 555 ; A21428, Life technologies) et anticorps de chèvre anti-souris 1:1000 Alexa 488 (A11029, Life technologies) pendant 2 heures dans l'obscurité à température ambiante. Les sections sont lavées avec du PBS (3 fois pendant 15 minutes chacune) et contre-colorées pendant 5 minutes avec 0,5- μ g/ml de 4,6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich), puis rincées dans du PBS pendant 5 minutes, séchées à l'air et recouvertes de Glycergel (CO563, DAKO). Les sections sont observées avec le microscope Olympus BX61 et les images sont acquises avec un grossissement 20 \times et 40 \times .

II) Article 1: Acute Visceral Pain in Rats: Vagal Nerve Block Compared to Bupivacaine Administered Intramuscularly.

A) Présentation de l'article :

Dans le premier article, nous avons voulu évaluer le rôle du nerf vague et des anesthésiques locaux dans la douleur aiguë et notamment sur l'intégration du message douloureux au niveau du système nerveux central.

Nous nous sommes intéressés aux anesthésiques locaux car comme décrit dans la littérature, il existe un effet antalgique prouvé des anesthésiques locaux. Cette analgésie est notamment observée en postopératoire soit après chirurgie colorectale par la mise en place d'un cathéter délivrant une perfusion préopéritoneale de ropivacaïne (Beaussier et al. 2007), soit lors d'une injection intrapéritoneale d'anesthésique local au décours des cholécystectomies sous coelioscopie (Kaushal-Deep et al. 2018) ou encore lors de la réalisation de bloc analgésique de paroi (Fusco et al. 2016). Les anesthésiques locaux présentent de nombreuses particularités pharmacologiques :

- ces molécules bloquent de manière réversible la conduction nerveuse périphérique en se fixant aux canaux sodiques (Beloil, Mazoit, 2010).
- ces molécules ont une activité anti-inflammatoire mise en évidence dans plusieurs études expérimentales (Beloil et al. 2005), (Beloil, Ji, et Berde 2006), (Blumenthal et al. 2006).

Cependant le mécanisme anti-inflammatoire au niveau du système nerveux central n'est pas encore complètement élucidé et c'est encore plus vrai en ce qui concerne ses conséquences sur l'intégration du message douloureux viscéral. On peut déduire certaines propriétés par analogie avec d'autres types d'activation cellulaire. Il a été démontré dans un modèle de douleur neuropathique une diminution de la densité cellulaire microgliale et astrocytaire au niveau de la moelle après injection de ropivacaïne (Toda et al. 2011). Dans un autre modèle de culture cellulaire microgliale stimulé avec du LPS, la lidocaïne diminuait la synthèse de prostaglandine E2, IL1 β et de TNF-alpha par les cellules microgliales (T. Yuan et al. 2014).

Ainsi, nous avons souhaité étudier l'effet des anesthésiques locaux sur la douleur viscérale aussi bien par voie systémique que par l'intermédiaire d'un bloc analgésique sur l'intégration du message douloureux au niveau du SNC et le comparer au rôle du

nerf vague dans la transmission de la douleur. Dans un second temps, nous avons voulu évaluer l'effet des anesthésiques locaux sur les cellules microgliales dans un modèle de douleur viscérale aigue.

B) Article 1

Article accepté et publié par Anesthesia Analgesia en novembre 2021.

**Acute visceral pain in rats: vagal nerve block compared to bupivacaine
administered intramuscularly**

Mouna Ben Rehouma M.D. ^{1,2 *}

Toni Kfoury M.D., Ph.D., ^{1,3 *}

Leila Hamdi Ph.D. ¹

Meriem Bouchouareb M.S. ¹

Mickael Soued M.D. ^{1,4}

Dan Benhamou M.D. ^{1,3}

Jean Xavier Mazoit M.D., Ph.D. ^{1,#}

¹ Paris-Saclay University and INSERM U1195 Faculté de Médecine de Bicêtre 63 Rue Gabriel Péri 94270 Le Kremlin-Bicêtre France

² Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, Hôpital Bichat, Hôpitaux Universitaires Paris-Nord, APHP

³ Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, Hôpital Bicêtre, Hôpitaux Universitaires Paris-Saclay, APHP, - 78, rue du Général Leclerc 94275 Le Kremlin Bicêtre Cedex France

⁴ Department of Anesthesiology, Hôpital Antoine Béchère, Hôpitaux Universitaires Paris-Saclay, APHP, 157 rue de la Porte de Trivaux, 92140 Clamart.

* These authors contributed equally.

Author for correspondence. Laboratoire d'Anesthésie, INSERM U1195 Faculté de Médecine de Bicêtre 63 Rue Gabriel Péri 94270 Le Kremlin-Bicêtre France

e-mail: jean-xavier.mazoit@universite-paris-saclay.fr

Conflicts of interest. None.

Funding. This work was funded by INSERM (Institut national de la santé et de la recherche médicale) and MAPAR (Mises au Point en Anesthésie-Réanimation). Leila Hamdi is employee of MAPAR.

Word count: Abstract 334 words, Introduction 389 words, discussion 986 words, overall word count 3715.

Abbreviated Title. Vagal block or i.m. bupivacaine to treat peritoneal pain.

Authors' contribution.

Mouna Ben Rehouma M.D. This author helped to design the study; made significant contribution to immunohistology, initial analysis and first draft.

Toni Kfoury M.D., Ph.D. This author helped to design the study, performed nerve blocks; made significant contribution to initial analysis and first draft.

Leila Hamdi Ph.D. This author made significant contribution to immunohistology and initial analysis.

Meriem Bouchouareb M.S. This author made significant contribution to immunohistology and initial analysis.

Mickael Soued M.D. This author made significant contribution to immunohistology and initial analysis.

Dan Benhamou M.D. This author made significant contribution to initial analysis, first draft and revision.

Jean Xavier Mazoit M.D., Ph.D. This principle investigator was responsible for the conception and design of the study, initial analysis, statistical analysis, first draft and revision.

All authors discussed and approved the final manuscript as submitted.

ABSTRACT

Background. Visceral and parietal peritoneum layers have different sensory innervations. Most visceral peritoneum sensory information is conveyed via the vagus nerve to the nucleus of the solitary tract (NTS). We already showed in animal models, that intramuscular (i.m.) injection of local anesthetics decreases acute somatic and visceral pain and general inflammation induced by aseptic peritonitis. The goal of the study was to compare the effects of parietal block, intramuscular bupivacaine and vagotomy on spinal cord and NTS stimulation induced by a chemical peritonitis.

Methods. We induced peritonitis in rats using carrageenan and measured cellular activation in spinal cord and NTS under the following conditions, i.e. a parietal nerve block with bupivacaine, a chemical right vagotomy and i.m. microspheres loaded with bupivacaine. c-Fos, CD11b and TNF- α expression in cord and NTS was studied.

Results. c-Fos activation in the cord was inhibited by nerve block 2 hours after peritoneal insult. Vagotomy and i.m. bupivacaine similarly inhibited c-Fos activation in NTS. Forty eight hours after peritoneal insult, the number of cells expressing CD11b significantly increased in the cord ($p = 0.010$). The median difference in the effect of peritonitis compared to control was 30 cells (CI95 13.5-55). TNF- α colocalized with CD11b. Vagotomy inhibited this microglial activation in the NTS, but not in the cord. This activation was inhibited by i.m. bupivacaine both in cord and NTS. The median difference in the effect of intramuscular bupivacaine added to peritonitis was 29 cells (80 % increase) in the cord and 18 cells (75 % increase) in the NTS. Our study underlines the role of the vagus nerve in the transmission of an acute visceral pain message and confirmed that systemic bupivacaine prevents noxious stimuli by inhibiting c-Fos and microglia activation.

Conclusions. In rats receiving intraperitoneal carrageenan, intramuscular bupivacaine similarly inhibited c-Fos and microglial activation both in cord and in the nucleus of the solitary tract. Vagal block inhibited activation only in the NTS. Our study underlines the role of the vagus nerve in the transmission of an acute visceral pain message and confirmed that systemic bupivacaine prevents noxious stimuli. This emphasizes the effects of systemic local anesthetics on inflammation and visceral pain.

KEY POINTS SUMMARY.

Question: Does intramuscular bupivacaine inhibit higher brainstem structures activation after experimental peritonitis in rats?

Findings: Intramuscular bupivacaine and vagotomy inhibited c-Fos and microglia activation in NTS in a similar manner.

Meaning: Our experiment may explain in part the mechanism of the beneficial effect of systemic local anesthetics after abdominal surgery.

Glossary of terms

CD11b Cluster of differentiation protein 11b

c-Fos Proto-oncogene c-Fos

GCSF Ggranulocyte colony stimulating factor

GFAP Glial fibrillary acidic protein

CNS Central nervous system

IBA-1 Allograft inflammatory factor 1

IL1- β Interleukin 1- β

IL6 Interleukin 6

LPS Lypopolysaccharide

mRNA Messenger RNA

MS-Bupi Bupivacaine-releasing microspheres

NTS nucleus of the solitary tract

PBS Phosphate buffer solution

TNF- α Tumor Necrosis Factor alpha

INTRODUCTION

Pain pathways of visceral pain are much less well understood than those of somatic pain. Intra-abdominal organs and visceral peritoneum on one side and abdominal wall and the parietal peritoneum layer on the other side have different sensory innervations.¹ If the parietal part has a simple metameric afferent innervation to the dorsal horn, the visceral sensory information is conveyed 1) via fibers that terminate in the posterior dorsal horn after transiting into the paravertebral sympathetic ganglion and 2) via the vagus nerve which ascending pathway reaches the nucleus of the solitary tract (NTS), with primary cell bodies in the nodose ganglion.¹ Thus, part of the visceral nociception may not be accompanied by a painful sensation.¹ Microglial signaling may also participate to sensitization both at spinal cord and at the brainstem level.²

In the postoperative period after abdominal surgery, patients may experience severe visceral pain. Apart from traditional analgesics, local anesthetics and regional anesthesia may be helpful. Parietal blocks alone are able to relieve visceral pain both in experimental³ and clinical conditions⁴ but not in all studies.⁵ Blocks acting on the paravertebral sympathetic ganglions (i.e. celiac plexus block) combined with a parietal block (i.e. TAP block) could be effective to inhibit somatic and visceral afferences of postoperative pain.⁶ Local anesthetics administered intraperitoneally may also be effective.^{7,8} Intravenous infusion of lidocaine decreases postoperative pain during and after abdominal surgery, improves patient rehabilitation and decreases hospital length of stay.^{9,10} Anti-inflammatory properties of amide local anesthetics such as lidocaine or bupivacaine have been proposed to explain this effect.^{11,12} In previous rat experiments, we showed that systemically administered local anesthetics were able to decrease visceral pain induced by different models.^{3,13} In addition, treated animals had lower local and general inflammation as shown by a lower production of TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha) in whole blood and peritoneal macrophage cultures stimulated by LPS (lypopolysaccharide).

However, other mechanisms may be advocated^{14,15}, inasmuch as the same effects have not been reported for other types of surgery.^{16,17} In addition, the role of the vagal pathway has not received in-depth examination in acute pain situations.

In the present rat model of chemical peritonitis, we aimed to measure the effects of vagotomy on spinal cord and NTS activation and we compared its effects to those produced by bupivacaine administered intramuscularly or by a parietal nerve block.

MATERIALS AND METHODS

Animals

This experiment was performed on male Sprague-Dawley rats weighing 175 to 225 g (Elevage Janvier, Le Genest-St-Isle, France) according to the ARRIVE guidelines. Rats were housed at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ with food and water available ad libitum and maintained on a 12 h light dark cycle. Ethical approval for this study was provided by the Comité d'Ethique en Expérimentation animale N°26 (CEEA 26, Paris-Sud, N° 2012_089). All procedures were performed under isoflurane anesthesia. 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. Bupivacaine-releasing microspheres (MS-Bupi) and the corresponding vehicle were kindly supplied by Pr Le Corre (Service de Pharmacie, CHU de Rennes, France).¹⁸ MS-bupi contained 37.5 mg bupivacaine hydrochloride, 49.9 mg RG503H (D, L-Polylactide-co-glycolide polymer), 125 mg mannitol and 1.25 mg Tween 20 to be diluted in water. The vehicle consisted of 49.9 mg of RG503H, 125 mg of mannitol and 1.25 mg of Tween 20 to be diluted in water. Absolute ethanol and carrageenan were from Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Trypan blue was from SERB laboratories, Paris, France).

Experimental groups (Table 1)

In a first series of experiments (effect of parietal block), rats ($n = 8$ / group) were randomly assigned to 4 groups. Briefly, 1 mL of 2.5% carrageenan or saline and 15 mg/kg of 0.25% bupivacaine with 1:200,000 epinephrine or saline were injected in the wall or peritoneum. An additional control group of 6 rats received the same volume of

saline. c-Fos reactive nuclei were counted in the dorsal horn two hours after inflammation induction. Because inflammation was bilateral, the numbers of nuclei expressing c-Fos in the right and left dorsal horn were averaged.

In a second series of experiments, rats ($n = 2 \times 7$ / group) were randomly assigned to 5 groups studied at 2h (maximal c-Fos labeled nuclei) and 48h (maximal microglia stimulation) after insult. The number of c-Fos reactive nuclei in the NTS was measured 2 hours after insult and the number of CD11b and of TNF- α reactive cells was measured in dorsal horn and NTS, 2 and 48 hours after inflammatory injury.

Procedures

The parietal block was performed as previously described.³ Briefly, 0.25% bupivacaine with 1:200,000 epinephrine diluted at the desired concentration (50 μ L/site) (total dose bupivacaine 15 mg/kg) was injected on both sides of the vertebral column 3 mm lateral to the spinous process at the T5, T10, L1, L4 and S1 levels using a 25 G needle. Intramuscular injection of MS-bupi at the desired concentration (20 mg/mL) (total dose bupivacaine 20 mg/kg) was performed in the rat thigh using a 23 G needle.

Peritoneal inflammation was thereafter performed using 2.5% carrageenan freshly diluted in normal saline and injected in the abdominal wall on both sides of the linea alba (0.5 mL on each side) or in the peritoneal cavity according to the experimental group. Control groups received the same volumes of saline.

As the right vagus nerve is supposed to convey around 70 % of the afferent pathway¹⁷, a right cervical vagotomy was performed by a supraclavicular injection of 30 μ L of absolute ethanol mixed with trypan blue forty eight hours before initiation of the inflammatory insult. In all rats that undergone vagotomy, a right cervical and gastric dissection was achieved after euthanasia to verify the distribution of trypan blue along the right vagus nerve and the presence of gastric distension.

Immunostaining

At the end of the experiment, rats were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg kg⁻¹ intraperitoneally) and perfused intracardially with 4% paraformaldehyde in 0.6 M phosphate buffer as previously described.³ The spinal cord and brain were removed and postfixed in the same fixative overnight. The spinal cord was then cut in segments of two metamers before paraffin inclusion. Serial transverse sections of 7 µm of spinal cord slices and brainstem were cut and dried for 48h. After wax removal and rehydration, the sections were washed twice with 0.15 M PBS solution and immersed in 2% H₂O₂ for 30 min.

For c-Fos labeling, sections were pre-treated with 1% normal goat serum (Vector Laboratories) and 0.3% Triton X-100 in 0.15 M PBS (NGST) for 1 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, Courtaboeuf France) 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. The sections were mounted on adhesion microscope slides SuperFrost plus® (Roth laboratories, Lauterbourg, France), and coverslipped. c-Fos reactive cells were localized under light-field microscopy (Nikon, Eclipse E2000) at 10x and 40x. Four sections corresponding to each two-metamer segment and exhibiting the greatest number of labeled cells were selected from each rat by two independent investigators blind to the experimental condition. The 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 each observer and the average value (duplicate) was selected. Similarly, four sections of the brainstem passing by the nucleus of the solitary tract and exhibiting the greatest

number of labeled cells were equally selected and the number of cells in the total nucleus was measured as above.

For CD11b and TNF- α labeling, sections were incubated for 20h at 4°C with a mouse monoclonal antibody against CD11b/c (ab1211, Abcam, Paris France) 1:100 and a rabbit polyclonal antibody against TNF- α (ab66579, Abcam, Paris France) 1:100. The sections were rinsed in PBS (3 times for ten minutes each) and incubated with secondary antibodies (goat anti rabbit 1:1000 Alexa 555 (A21428, Life technologies, France) and goat anti-mouse 1:1000 Alexa 488 (A11029, Life technologies, France) for 2 hours in the dark at room temperature. Sections were washed with PBS (3 times for 15 minutes each) and counterstained for 5 minutes with 0.5 μ g/mL DAPI (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France), then rinsed in PBS for 5 minutes, air dried and cover-slipped using Glycergel (CO563, DAKO, Les Ulis, France). The selection of sections and the quantification of the number of colocalized CD11b and TNF- α cells were performed as described for c-Fos labeling. Sections were observed with the Olympus BX61 and images were acquired at 20X and 40X.

Statistics

Because all measured data are counts (number of nuclei or cells), and considering the small number of data, the analysis was performed using the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's test with the Holms correction. For the second experiment analysis, the vagotomy group was separately compared to control and not included for further multiple comparisons. In addition to direct comparisons of counts, we calculated the median difference in effect for peritonitis vs. control and peritonitis + bupivacaine vs. peritonitis groups using bootstrap with 2500 replications. The bias-corrected and accelerated 95 % confidence interval of the median difference (CI95) was also calculated. Consistency between observers was considered using intraclass correlation. Data are reported as the median, interquartile range (IQR), range and

number of subjects as appropriate. Adjusted P values are reported and $P < 0.05$ was considered the limit of significance.

Power analysis was performed using the GPower 3.1 software.¹⁹ The number of animals required for each experiment was calculated considering a power of 80 %, an alpha risk (bilateral corrected for multiple comparisons) of 5 % and a Cohen d (based on c-Fos counts) of 0.65 and 0.80 for the first and second experiments respectively (see Table 1 for the number of animals in each experiment).

Results.

The agreement (consistency) between the two observers was excellent with an intraclass correlation coefficient of 0.90 (95%CI 0.82-0.99) for c-Fos counts and 0.96 (95%CI 0.88-0.99) for CD11b and CD11b + TNF counts, respectively.

c-Fos (Table 2 and Fig. 1)

In the spinal cord, the number of c-Fos reactive nuclei significantly increased in the four groups receiving carrageenan as compared to control ($p < 0.0001$) and significantly decreased in the two groups treated by parietal block as compared to their corresponding non-treated groups ($p = 0.0016$). The median difference in effect between the Peritonitis + Vehicle and the Control group was 29 nuclei (CI95 26-32). The median difference in effect between the Peritonitis + Vehicle and the Peritonitis + Bupivacaine group was 13 nuclei (CI95 10-17).

Although vagotomy was unilateral, no significant difference was observed between the two sides of the NTS. The data of the left and right sides were then averaged for further analysis. Vagotomy alone did not modify the number of reactive nuclei in the NTS as compared to control ($p = 0.18$). Peritonitis dramatically increased the number of reactive nuclei in the NTS two hours after injury ($p < 0.0034$) and the median difference in effect between peritonitis and control was 26.5 nuclei (CI95 10-33). Both vagotomy and intramuscular MS-Bupi counteracted c-Fos increase in the NTS after peritonitis. The median difference in the effect of MS-bupi added to peritonitis was 22 nuclei (CI95 12-39).

CD11b and CD11b+TNF- α colocalization (Table 2 and Fig. 2, 3 and 4)

In a similar manner to that observed with c-Fos labeling, no difference between the two sides of the NTS was observed. The data of the left and right sides were then averaged for further analysis.

In both the spinal cord and the NTS, peritonitis did not significantly change the number of CD11b and CD11b + TNF reactive cells as compared to control at 2h after injection. However, 48h after carageenan injection, the number of CD11b reactive cells significantly increased in the Perit group in the cord only ($p = 0.010$). The median difference in the effect of peritonitis compared to control was 30 cells (CI95 13.5-55) in the cord at H48. Forty eight hours after injury, the number of CD11b + TNF reactive cells significantly increased in the Perit group as compared to the Cont group in the spinal cord ($p < 0.0001$) and the NTS ($p < 0.0001$). The median difference in the effect of peritonitis compared to control was 33.5 cells (CI95 18-43.5) in the cord and 19.5 cells (CI95 11.5-38) in the NTS. The shape of CD11b cells was also modified in the treated groups (**Fig. 4**). At the same time, i.m. MS-Bupi produced a dramatic decrease in the number of CD11b + TNF reactive cells in both the cord and NTS (**Fig. 2 and Fig. 3**). The median difference in the effect of MS-bupi added to peritonitis was 29 cells (CI95 13-39) in the cord and 18 cells (CI95 2.5-36.5) in the NTS. Vagotomy had no significant effect on the increased number CD11b and CD11b + TNF reactive cells in the peritonitis group in the cord (**Fig. 2**), but significantly decreased the number of reactive cells in the NTS ($p = 0.0004$, Perit + Vago vs. Perit groups) (**Fig. 3**).

4. DISCUSSION

The present study explored the integration of acute visceral pain in the central nervous system (CNS) in the spinal cord to assess the effects on the sensory spinal afferents and at the level of NTS to assess the effect on the vagus nerve. The effects of vagotomy and local anesthetic administration either through parietal block or systemic injection were added to better interpret this integration. Acute visceral pain induced the same pattern of activation in the NTS than in the cord in rats. As expected, two hours after peritoneal insult, c-Fos reactivity was observed both in the cord and NTS, whereas microglial activation was detected only in the 48 h delayed measurements. Vagotomy and i.m. bupivacaine similarly inhibited this activation in the NTS. Vagotomy had no significant effect in the cord.

First, our study confirmed the role of the vagus nerve in the transmission of the acute visceral pain message and builds on the previously described results of the literature.^{20,21} Gallaher et al. observed an increased microglial activation 14 and 42 days after surgical bilateral vagotomy.²² Although vagotomy was only unilateral (right), no difference between the two sides of the NTS was observed for c-Fos labeling and microglial activation. The above mentioned results remain unexplained so far, although the numerous anastomoses between the right and left vagus nerves may explain part of this result.²³

Second, our data also confirmed the key role of microglia in the integration of acute visceral pain.²⁴ Different models of acute and chronic pain emphasize the role of microglia in the integration of the pain message. After hind paw injection of carrageenan, spinal cord expression of the microglia-specific protein IBA-1 mRNA increased as early as one hour after injury, while the increased expression of the astrocyte marker GFAP mRNA began only 6 hours after injury.²⁴ However, microglia activation observed by immunostaining appears only 1-3 days after insult.^{25,26} Our model of peritonitis

corroborates these results. Microglia activation was indeed not observed at two hours but at 48 hours we observed an increase in reactive CD11b cells as well as cellular structural changes (microgliosis) both in the spinal cord and in the NTS (**Fig. 4**). These markers of microglia activation were observed later than in the study by Lu et al., in which the early phase of RNA transcription was studied.²⁴

After an acute visceral inflammatory insult, the cascade of events that takes place in the CNS has not been as widely studied contrary to what has been done after direct nerve or chronic inflammatory insult leading to neuropathic pain.²⁵ Immunostaining using colocalization with TNF- α allowed us to confirm that microglia activation provokes a cascade of cytokine proinflammatory production after acute visceral injury. Other studies found similar results. Lu et al.²⁴ showed that inflammatory cytokine mRNAs (TNF- α , IL1, IL6) were also expressed in the cord as soon as 3 hours after carrageenan injection. In a model of colitis, elevated levels of IL1 β , GCSF (granulocyte colony stimulating factor) and IL6 were observed in the spinal cord compared to control mice.²⁷ At the same time more microglial cells were found in the spinal cord by flow cytometry. However, to our knowledge, our study is the first that shows both an increased number of microglial cells and microglial activation with proinflammatory cytokine production in the NTS in an acute visceral pain model. In all peritonitis groups, microglia developed cellular hypertrophy (microgliosis) contrary to control groups in which CD11b cells remained small (**Fig. 4**).

Other actors, and notably astrocytes, may play a role in the integration of acute visceral pain message in the CNS.²⁸ For example, in satellite (i.e. sensory, sympathetic and parasympathetic) ganglions, complex relationships between microglia, astrocytes and neuron modulate pain.²⁹ Similarly, Morales-Soto et al. showed that enteric astrocytes probably modulate the transmission of the visceral message.³⁰ However, the link between those glial cells is not well understood in acute visceral pain and requires more investigation.

Because local anesthetic kinetics is very rapid in rodents, we used either bupivacaine 0.25% with epinephrine 1/200,000 for parietal block or plain bupivacaine encapsulated in microspheres for i.m. injections. Both mode of administration performed before peritonitis reduced the noxious message transmission to the dorsal horn and the NTS as shown by significantly less c-Fos activation in these structures. The efficacy of other types of parietal block has also been observed on visceral pain in clinical studies.³¹⁻³⁴ Despite local anesthetic efficacy after regional administration, their mechanism of action is not well understood. Intravenous infusion of lidocaine decreases postoperative pain during and after abdominal surgery.^{9,10} whether or not abdominal wall incision has been performed.³⁶ We have already shown in rats that i.m. ropivacaine produces similar effects as a preperitoneal infusion on acute pain in a model of aseptic peritonitis.¹³ In addition, i.m. injection and preperitoneal ropivacaine infusion similarly decreased activation of both peritoneal and systemic macrophages.¹³

Because a similar degree of inhibition was observed with either i.m. or parietal administration of bupivacaine, our hypothesis is that local anesthetics exert their beneficial effect in visceral pain mainly through their systemic action. Systemic bupivacaine was effective both on the early stimulation as seen by c-Fos signal inhibition and on the delayed stimulation, likely by its anti-inflammatory activity as seen by the inhibition of microglia activation. Our data indeed suggest for the first time that a local anesthetic has an anti-inflammatory effect in the NTS and spinal cord probably by inhibiting microglia activation in acute visceral pain.

In conclusion, our study underlines the role of the vagus nerve in the transmission of an acute visceral pain message, and highlights the key role of microglia in the integration of the message in the CNS especially in the NTS. Our study emphasizes that the proinflammatory cascade is mediated by activated microglial cells in the CNS in acute visceral pain. At the same time, we confirmed our hypothesis that systemic

bupivacaine has an antinociceptive and anti-inflammatory effect in acute visceral pain by inhibiting c-Fos and microglia activation after visceral injury.

ACKNOWLEDGMENTS.

Larbi AMAZIT Ph.D. UMR-S 1185 for image processing. Larbi AMAZIT was supported by a grant from MAPAR.

REFERENCES

1. Gebhart GF, Bielefeldt K. Physiology of Visceral Pain. *Compr Physiol*. 2016;6(4):1609-1633. [PMID: 27783853].
2. Chen G, Zhang YQ, Qadri YJ, Serhan CN, Ji RR. Microglia in Pain: Detrimental and Protective Roles in Pathogenesis and Resolution of Pain. *Neuron*. 2018;100(6):1292-1311. [PubMed: 30571942].
3. Kfoury T, Ben Rehouma M, Zetlaoui PJ, Benhamou D, Mazoit JX. Parietal Block Using Bupivacaine in the Rat: An Anatomical, Behavioral and Histological Study. *J Pain Res* 2020;13 17–24. [PubMed: 32021391].
4. Petersen PL, Stjernholm P, Kristiansen VB et al. The beneficial effect of transversus abdominis plane block after laparoscopic cholecystectomy in day-case surgery: a randomized clinical trial. *Anesth Analg*. 2012;115:527-33. [PubMed: 22763903].
5. Freir NM, Murphy C, Mugawar M, Linnane A, Cunningham AJ. Transversus abdominis plane block for analgesia in renal transplantation: a randomized controlled trial. *Anesth Analg*. 2012 Oct;115(4):953-7. [PubMed: 22763899].
6. Taleb A, Boumadani M, Zetlaoui PJ, Benhamou D. Major Laparoscopic Intraoperative Surgery Performed With Combined Bilateral Subcostal Transversus Abdominal Plane Block and Celiac Plexus Block, Intravenous Sedation Without Tracheal Intubation: A Feasibility Study of 3 Cases. *Reg Anesth Pain Med* 2018;43(6):621-624. [PubMed: 29794942].
7. Wei X, Yao X. The Impact of Intraperitoneal Levobupivacaine on Pain Relief After Laparoscopic Cholecystectomy: A Meta-analysis of Randomized Controlled Studies. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*. 2020;30(1):1-6. PubMed: 31913214.

8. Perniola A, Magnuson A, Axelsson K, Gupta A. Intraperitoneal local anesthetics have predominant local analgesic effect: a randomized, double-blind study. *Anesthesiology*. 2014;121(2):352-61. PubMed: 24758776.
9. Marret E, Rolin M, Beaussier M, Bonnet F. Meta-analysis of intravenous lidocaine and postoperative recovery after abdominal surgery. *Br J Surg*. 2008;95(11):1331-1338. [PubMed: 18844267].
10. Terkawi AS, Tsang S, Kazemi A, et al. A Clinical Comparison of Intravenous and Epidural Local Anesthetic for Major Abdominal Surgery. *Reg Anesth Pain Med*. 2016;41(1):28-36. [PubMed: 26650426].
11. 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(4):1081-1086. [PubMed: 15781526].
12. van der Wal SE, van den Heuvel SA, Radema SA, et al. The in vitro mechanisms and in vivo efficacy of intravenous lidocaine on the neuroinflammatory response in acute and chronic pain. *Eur J Pain*. 2016;20(5):655-674. [PubMed: 26684648].
13. Kfoury T, Mazoit JX, Schumacher M, Benhamou D, Beloeil H. A comparison of different dosages of a continuous preperitoneal infusion and systemic administration of ropivacaine after laparotomy in rats. *Anesth Analg*. 2011;113(3):617-625. [PubMed: 21596868].
14. Deruddre S, Combettes E, Estebe JP, et al. 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.* 2010;24(4):652-659. [PubMed: 20144702].

15. 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(1-2):217-224. [PubMed: 10692621].

16. Martin F, Cherif K, Gentili ME, et al. Lack of impact of intravenous lidocaine on analgesia, functional recovery, and nociceptive pain threshold after total hip arthroplasty. *Anesthesiology.* 2008;109(1):118-123. [PubMed: 18580181].

17. Bertoud HhR, Neuhuber WL. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Auton Neurosci.* 2000;85(1-3):1-17. [PubMed: 11189015].

18. Ratajczak-Enselme M, Estebe JP, Dollo G, et al. Epidural, intrathecal and plasma pharmacokinetic study of epidural ropivacaine in PLGA-microspheres in sheep model. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;72(1):54-61. [PubMed: 19061956].

19. Faul F, Erdfelder E, Lang A.-G, Buchner A. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods* 2007;39:175-191. [PubMed: 17695343]

20. Hwang SW, Oh U. Current concepts of nociception: nociceptive molecular sensors in sensory neurons. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2007;20(5):427-434. [PubMed: 17873595].

21. Traub RJ, Sengupta JN, Gebhart GF. Differential c-fos expression in the nucleus of the solitary tract and spinal cord following noxious gastric distention in the rat. *Neuroscience.* 1996;74(3):873-884. [PubMed: 8884783].

22. Gallaher ZR, Ryu V, Herzog T, Ritter RC, Czaja K. Changes in microglial activation within the hindbrain, nodose ganglia, and the spinal cord following subdiaphragmatic vagotomy. *Neurosci Lett.* 2012;513(1):31-36. [PubMed: 22342909].
23. Horn CC, Friedman MI. Thoracic cross-over pathways of the rat vagal trunks. *Brain Res.* 2005 Oct 26;1060(1-2):153-61. [PubMed: 16197931].
24. Lu Y, Zhao LX, Cao DL, Gao YJ. Spinal injection of docosahexaenoic acid attenuates carrageenan-induced inflammatory pain through inhibition of microglia-mediated neuroinflammation in the spinal cord. *Neuroscience.* 2013;241:22-31. [PubMed: 23500096].
25. Obata H, Eisenach JC, Hussain H, Bynum T, Vincler M. Spinal glial activation contributes to postoperative mechanical hypersensitivity in the rat. *J Pain.* 2006;7(11):816-822. [PubMed: 17074623].
26. Zhuang ZY, Wen YR, Zhang DR, et al. A Peptide c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) Inhibitor Blocks Mechanical Allodynia after Spinal Nerve Ligation: Respective Roles of JNK Activation in Primary Sensory Neurons and Spinal Astrocytes for Neuropathic Pain Development and Maintenance. *J Neurosci.* 2006; 26(13): 3551–3560. [PubMed: 16571763].
27. Basso L, Lapointe TK, Iftinca M, et al. Granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF) signaling in spinal microglia drives visceral sensitization following colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(42):11235-11240. [PubMed: 28973941].
28. Ji RR, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ. Central sensitization and LTP: Do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci.* 2003;26(12):696–705. [PubMed:

29. Hanani M, Spray DC. Emerging importance of satellite glia in nervous system function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci.* 2020;21(9):485-498. [PubMed: 32699292].
30. Morales-Soto W, Gulbransen BD. Enteric Glia: A New Player in Abdominal Pain. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2019;7(2):433-445. [PubMed: 30739868].
31. Beaussier M, El'Ayoubi H, Schiffer E, et al. Continuous preperitoneal infusion of ropivacaine provides effective analgesia and accelerates recovery after colorectal surgery: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Anesthesiology.* 2007;107(3):461-468. [PubMed: 17721249].
32. Fusco P, Cofini V, Petrucci E, et al. Transversus Abdominis Plane Block in the Management of Acute Postoperative Pain Syndrome after Caesarean Section: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Pain Physician.* 2016;19(8):583-591. [PubMed: 27906937].
33. Kaushal-Deep SM, Anees A, Khan S, Khan MA, Lodhi M. *Surg Endosc.* Randomized controlled study of intraincisional infiltration versus intraperitoneal instillation of standardized dose of ropivacaine 0.2% in post-laparoscopic cholecystectomy pain: Do we really need high doses of local anesthetics-time to rethink! 2018;32(7):3321-3341. [PubMed: 29340809].
34. Tran DQ, Bravo D, Leurcharusmee P, Neal JM. Transversus Abdominis Plane Block: A Narrative Review. *Anesthesiology.* 2019;131(5):1166-1190. [PubMed: 31283738].
35. Toda S, Sakai A, Ikeda Y, Sakamoto A, Suzuki H. 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*. 2011;7:2-11. [PubMed: 21211063].

36. Dunn LK, Durieux ME. Perioperative Use of Intravenous Lidocaine. *Anesthesiology*. 2017;126:729-737. [PubMed: 28114177].

Table 1:

Table 1. Experimental Groups									
Groups	Abdominal wall	Parietal block (Bupi 0.25% + epi 1/200,000)	Peritoneum	Vagal block	MS-Bupi (i.m.)	Dorsal horn H2	Dorsal horn H48	NTS H2	NTS H48
Experiment 1: effect of parietal block at 2 h									
Control			Saline			c-Fos			
Wall + vehicle	Carrageenan	Saline	Saline						
Wall + bupivacaine	Carrageenan	Bupivacaine	Saline						
Perit + vehicle	Saline	Saline	Carrageenan						
Perit + bupivacaine	Saline	Bupivacaine	Carrageenan						
Experiment 2: effect of vagotomy and i.m. bupivacaine at 2 and 48 h									
Control			Saline	Saline	Saline	CD11b	CD11b	c-Fos	CD11b
Vagotomy			Saline	Ethanol	Saline	TNF- α	TNF- α	CD11b	TNF- α
Perit			Carrageenan	Saline	Saline				
Perit + vago			Carrageenan	Ethanol	Saline			TNF- α	
Perit + Bupi			Carrageenan	Saline	MS-Bupi				

Rats (n = 108) were studied in 2 experiments. In a first experiment, rats (n = 32, 8/group) were randomly assigned to 4 groups (carrageenan in the abdominal wall or in the peritoneal cavity with saline or bupivacaine for the block). An additional control group of 6 rats received the same volumes of saline. In a second experiment, rats (n = 70, 2 x 7/group) were randomly assigned to 2 x 5 groups studied at 2 and 48 h after insult. The number of c-Fos-labeled nuclei and CD11b and TNF- α labeled cells were measured in the dorsal horn and NTS.

Abbreviations: Bupi, bupivacaine; CD11b, cluster of differentiation protein 11b; c-Fos, proto-oncogene c-Fos; Epi, epinephrine; i.m., intramuscular; MS-Bupi, bupivacaine-releasing microspheres; NTS, nucleus of the solitary tract; Perit, peritonitis; TNF- α , tumor necrosis factor alpha; Vago, vagotomy; Wall, abdominal wall.

Table 2 :

Table 2. Number of c-Fos Reactive Nuclei (at 2 h After Insult) or CD11b and CD11b + TNF- α -Labeled Cells (at 48 h After Insult)					
First experiment					
	Vehicle	Wall	Wall + block	Peritonitis	Peritonitis + block
Cord c-Fos	5 (1.5, 4-6)	30 (6, 24-36.5)	17 (3, 13-19)	34 (4, 31.5-36.5)	20.5 (3.5, 16.5-24.5)
Second experiment					
	Vehicle	Vagotomy	Peritonitis	Peritonitis + vagotomy	Peritonitis+ MS-Bupi
NTS c-Fos	14 (2, 11.5-15.5)	9 (9, 4-22)	41 (12, 24.5-49.5)	15 (7, 13-23)	12 (7.5, 8.5-24)
Cord CD11b	18 (10, 7.5-30.5)	9.5 (25, 8-52)	48 (17, 17-69)	43 (12.5, 23-58.5)	15 (12, 6-30)
Cord CD11b + TNF	2 (2.75, 0-7.5)	2 (6.75, 0-17.5)	36.5 (12, 19.5-47)	21 (12, 11-38)	8 (4, 3-20)
NTS CD11b	18 (13.5, 13.5-47.5)	38.5 (21.25, 10-71)	27.5 (23.25, 17-47.5)	26.5 (5, 15.5-40)	17 (8.75, 6-72)
NTS CD11b + TNF	4.5 (3, 2-9)	8.5 (7.75, 1-14.5)	24 (20, 12.5-46)	8 (6, 3-12)	9 (9.75, 4-28)

Data are median (IQR, range) count. Rats received carrageenan in the abdominal wall or in the peritoneum and vehicle or bupivacaine (0.25% with epinephrine 1:200 000) as parietal block (first experiment) or MS-Bupi intramuscularly (second experiment). ROIs were superficial (I and II) and deep (V and VI) laminae of the dorsal horn and entire NTS. Data are average of right and left values.

Abbreviations: CD11b, cluster of differentiation protein 11b; c-Fos, proto-oncogene c-Fos; IQR, Interquartile range; MS-Bupi, bupivacaine-releasing microspheres; NTS, nucleus of the solitary tract; ROIs, regions of interest; TNF- α , tumor necrosis factor alpha; Wall, abdominal wall.

LEGEND OF FIGURES

Figure 1. Left. Number of c-Fos reactive nuclei in the spinal cord (a) and in the nucleus of the solitary tract (NTS) (b) 2 hours after injury.

a) All treated groups show a significant increase in the number of reactive nuclei as compared to control (* $p < 0.0001$). Parietal bloc with bupivacaine significantly decreased the number of reactive nuclei both in rats injected with carrageenan in the abdominal wall and in the peritoneum.

b) The number of c-Fos reactive nuclei significantly increased in the NTS 2 hours after carrageenan injection in the peritoneum. Vagotomy and intramuscular MS-Bupivacaine reset the number of reactive nuclei to control. * $p = 0.0034, 0.032$ and 0.0002 vs. Cont, Perit + Vago and Perit + MS-Bupi groups respectively. Although vagotomy was unilateral, no difference in the number of reactive nuclei was observed between right and left sides ($p = 0.71$). The average value of both sides is then represented on the graph.

Cont = control, Wall = abdominal wall, Vehic = vehicle, Perit = peritonitis, Bupi = Bupivacaine, MS-Bupi = MS-Bupivacaine. Boxes are median and 25-75 percentiles, bars are 10-90 percentiles.

Right. Typical microphotographs of spinal cord (C) and NTS (D) in animals from the peritonitis groups. Bar is 50 μm .

Figure 2. CD11b and CD11b + TNF- α reactive cells in the cord 48h after insult.

Left. Box plots representing the number of CD11b (a) and CD11b+TNF- α (b) reactive cells in the spinal cord.

a) * $p = 0.010, 0.21$ and 0.0009 vs. Cont, Perit + Vago and Perit + Bupi groups respectively.

b) * $p < 0.0001, 0.24$ and 0.0025 vs. Cont, Perit + Vago and Perit + Bupi groups respectively.

Cont = Control, Vago = Vagotomy, Perit = Peritonitis, Bupi = MS-Bupivacaine. Boxes are median and 25-75 percentiles, bars are 10-90 percentiles and dots are outliers.

Right. CD11b and CD11b +TNF- α expression the in spinal cord, 48 hours after injury.

A) In the Cont group, CD11b cells are stained in green. DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) staining identifies nuclei (blue). (B) In the Perit group, CD11b immunostaining markedly increases. TNF- α (red) colocalizes with CD11b (yellow). (C) In the Perit+MS-bupi group, the number of CD11b and CD11b + TNF- α cells is similar to the number of cells in the Cont group. Scale bar=50 μm .

Figure 3. CD11b and CD11b + TNF- α reactive cells in the NTS 48h after insult.

Left Box plots representing the number of CD11b (a) and CD11b+TNF- α (b) reactive cells in the nucleus of the solitary tract (NTS).

a) no difference was observed between groups (overall comparison $p = 0.18$).

b) * $p < 0.0001, 0.0004$ and 0.0025 vs. Cont, Perit + Vago and Perit + Bupi groups respectively.

Cont = Control, Vago = Vagotomy, Perit = Peritonitis, Bupi = MS-Bupivacaine. Boxes are median and 25-75 percentiles, bars are 10-90 percentiles and dots are outliers.

Right CD11b and CD11b + TNF- α expression the in the NTS, 48 hours after injury.

A) In the Cont group, CD11b cells are stained in green. DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) staining identifies nuclei (blue). (B) In the Perit group, CD11b + TNF- α (red) colocalizes with CD11b (yellow). (C) In the Perit+MS-bupi group, the number of CD11b and CD11b + TNF- α cells is similar to the number of cells in the Cont group. Scale bar=50 μ m.

Figure 4. Microglial cell morphology and CD11b + TNF- α colocalization in the NTS 48 hours after injury.

Nuclei are stained in blue (DAPI). CD11b cells are green (Alexa 488), CD11b + TNF- α expressing cells are orange ((Alexa 488 + 555).

(A) Control group, (B) Peritonitis group, (C) Peritonitis + vagotomy group, (D) Peritonitis+MS-bupivacaine group. Both the shape and number of CD11b cells is modified in the treated groups as compared to control.

Figure 1:

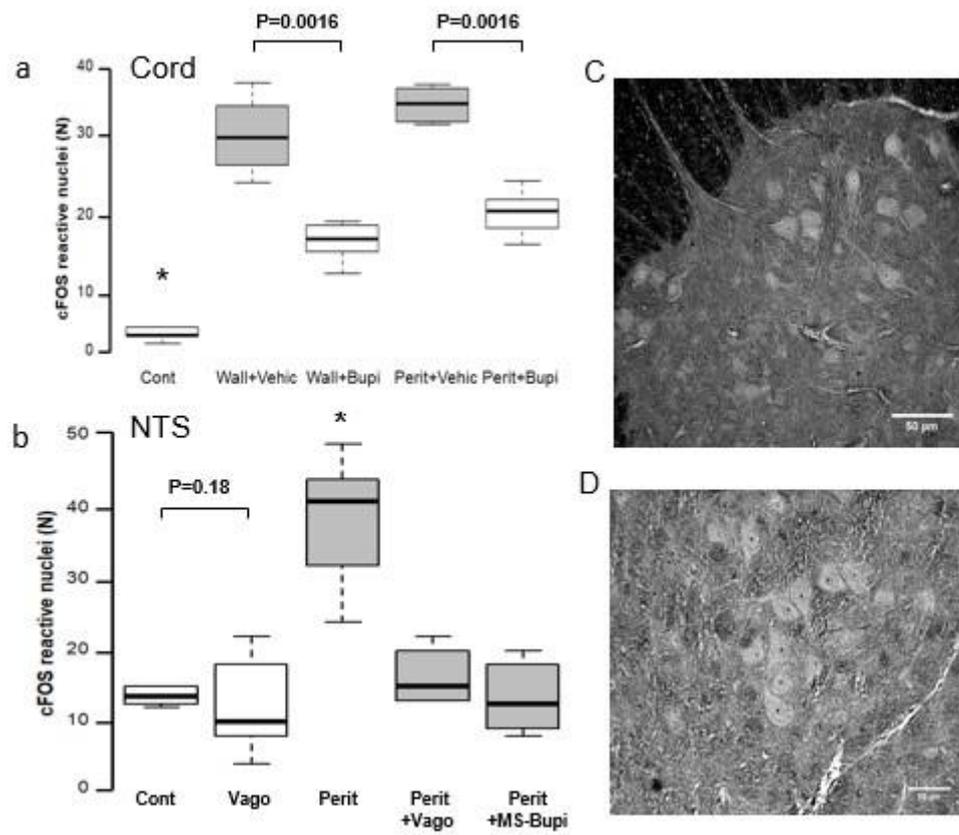


Figure 2:

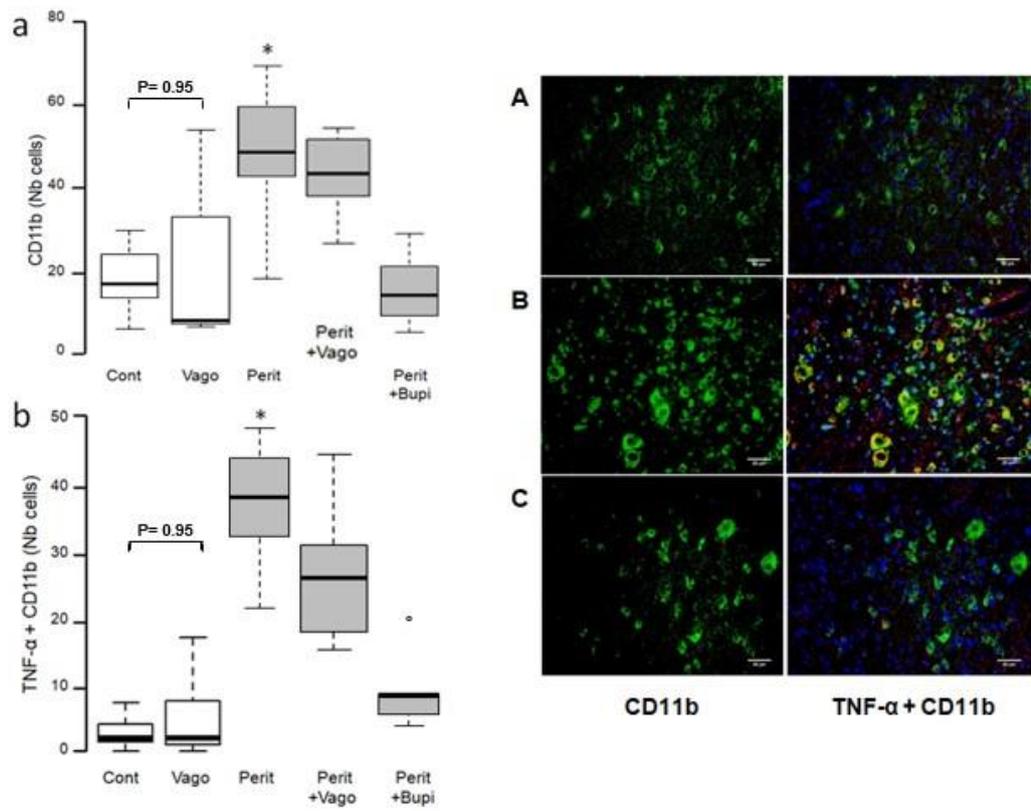


Figure 3:

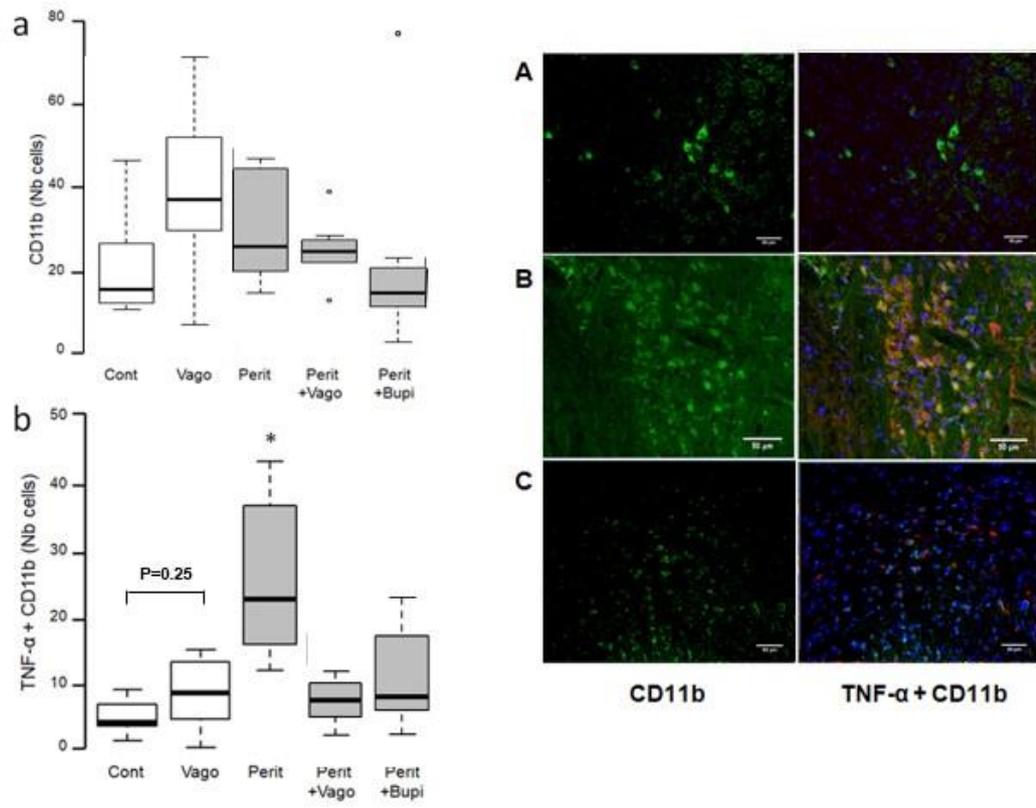
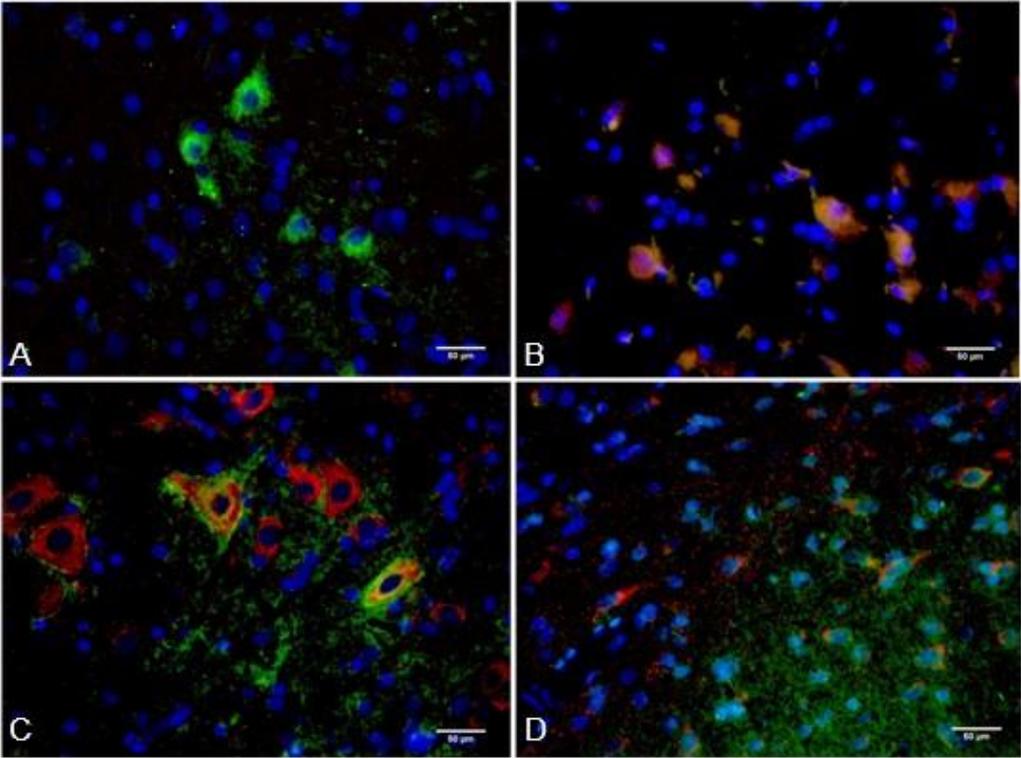


Figure 4 :



C) Discussion des résultats de l'article :

En premier lieu, notre étude a permis de confirmer le rôle essentiel du nerf vague dans la transmission du message douloureux viscéral ; ainsi nos résultats rejoignent ceux déjà décrits précédemment. Cependant, il est difficile d'expliquer sur le plan anatomique pourquoi nous retrouvons les mêmes résultats sur le noyau du tractus solitaire droit et gauche malgré le fait que nous n'ayons réalisé qu'une vagotomie droite. Des compléments de travaux sur l'acheminement du trajet douloureux viscéral par le nerf vague doivent être envisagés afin de répondre à la question.

En second lieu, nous avons aussi mis en évidence le rôle des cellules microgliales dans l'intégration du message douloureux viscéral aigu aussi bien au niveau médullaire qu'au niveau du noyau du tractus solitaire. Nos résultats confirment certaines données retrouvées dans la littérature et citées précédemment concernant l'activation microgliale au niveau médullaire mais nous décrivons à notre connaissance pour la première fois une activation microgliale associée à une libération de cytokines proinflammatoires dans le noyau du tractus solitaire dans un modèle de douleur viscérale aiguë.

En dernier lieu, nous avons essayé de comprendre au mieux le mécanisme d'action des anesthésiques locaux et leur efficacité dans la douleur viscérale aiguë. Nous avons pu confirmer notre hypothèse qui postulait que cette activité anti-inflammatoire passait par une diminution de la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (notamment de TNF- α) par les cellules microgliales au niveau médullaire et du tronc cérébral. Nous avons mis cela en évidence pour la première fois dans un modèle de douleur viscérale aiguë ; d'autres études doivent être réalisées afin de confirmer ces premiers résultats. De plus, le mécanisme spécifique d'inhibition des cellules microgliales par les anesthésiques locaux reste pour l'instant encore peu clair.

Cependant, notre étude ne répond pas à plusieurs interrogations. Premièrement, il existe très peu de données sur la dynamique temporelle d'activation des cellules microgliales dans la douleur viscérale aiguë. Après injection de carragénine dans la patte de la souris, il a été mis en évidence une augmentation significative de l'ARNm d'IBA-1 (marqueur microglial) une heure après le stimuli douloureux avec un pic à trois heures maintenu dans le temps pendant 24 heures (Lu et al. 2013). Cette même étude s'intéressait aussi à l'activation astrocytaire dans le même modèle de douleur et retrouvait une élévation

significative de l'ARNm de GFAP (marqueur astrocytaire) avec un décalage dans le temps par rapport à IBA-1, c'est-à-dire partir de 6h et jusqu'à 24h. Une autre étude s'est aussi intéressée à la cinétique d'activation microgliale et astrocytaire dans la moelle après incision plantaire chez le rat et mettait en évidence une augmentation de l'activité microgliale du 3ème jusqu'au 5ème jour par rapport au groupe contrôle, tandis que l'activation astrocytaire médullaire était significativement plus importante par rapport au groupe contrôle du 1er jusqu'au 5ème jour (Obata et al. 2006). Dans un modèle de douleur chronique viscérale (par inflammation colique), l'augmentation significative de la densité astrocytaire médullaire était observée du 3ème jusqu'au 14ème jour pour décroître et devenir comparable au groupe témoin à partir du 28ème jour (Sun et al. 2005). Romero-Sandoval et al ont comparé la cinétique d'activation astrocytaire et microgliale dans deux modèles de douleur différents : aigue par incision plantaire, et l'autre chronique de type neuropathique par ligature sciatique (Romero-Sandoval et al. 2008). Cette étude a mis en évidence une augmentation parallèle de l'expression de IBA-1 et de GFAP à partir du premier jour avec une baisse progressive et une normalisation au 7ème jour. Dans ce modèle de douleur neuropathique, l'expression d'IBA-1 était élevée à partir du premier jour et restait élevée même au septième jour, alors que l'expression de GFAP était significativement élevée à partir du 4ème jour et restait importante au 7ème jour.

Ces différentes études révèlent la complexité et les incertitudes concernant l'activation astrocytaire et microgliale dans la douleur, et soulignent l'hypothèse que cette activation varie en fonction des différents types de stimulation nociceptive. Cependant, la cinétique d'activation microgliale (encore moins astrocytaire) n'est pas décrite dans la littérature pour la douleur viscérale aigue.

C'est pourquoi nous avons souhaité dans un deuxième temps étudier la cinétique d'activation microgliale et astrocytaire dans un modèle de douleur viscérale aigue et mieux comprendre l'interaction entre ces cellules dans ce même modèle.

III) Article 2 : Activation of glial cells, production of TNF-alpha and interaction between microglia and astrocytes cells in a model of acute visceral pain in rats

A) Présentation de l'article :

Nous avons pu grâce à la première étude confirmer le rôle du nerf vague dans la transmission du message douloureux et mettre en évidence une activation microgliale aussi bien au niveau médullaire qu'au niveau de noyau du tractus solitaire. Nous avons pu aussi souligner l'influence des anesthésiques locaux sur l'activation microgliale dans ce modèle de douleur viscérale aigue.

Dans le second article, nous nous sommes plus intéressés au rôle des cellules gliales dans la douleur viscérale aigue.

En effet, nous n'avons pas du tout étudié l'activation astrocytaire dans notre modèle de douleur. Or cette activation a bien été mise en évidence dans différentes études sur la douleur, notamment dans la douleur neuropathique et inflammatoire. Il existe peu de données sur le rôle des cellules astrocytaires dans la douleur viscérale aigue, c'est pourquoi nous avons souhaité dans un premier temps confirmer leur activation dans ce même modèle de douleur viscérale aigue.

En second lieu, nous avons souhaité étudier la cinétique d'activation des cellules gliales dans notre modèle de douleur. En effet, il nous semble important de bien comprendre la chronologie d'activation de ces cellules afin de mieux les cibler sur le versant thérapeutique. Or à notre connaissance, il n'existe pas d'étude dans la littérature sur le timing d'activation de ces cellules dans la douleur viscérale aigüe. Il était donc important de pouvoir les comparer au modèle déjà bien exploré qu'est celui de la douleur neuropathique où il existe une activation microgliale première suivie par une activation astrocytaire qui perdurerait alors dans le temps.

Enfin, nous avons voulu évaluer l'influence de ces cellules entre elles. Les différentes études expérimentales ont permis de mettre en évidence qu'un stimulus douloureux engendre une modification de l'activité des cellules gliales, une modification de synthèse de médiateurs aussi bien intracellulaires qu'extracellulaires qui modifieraient alors leur activité. Cette modification d'activité d'une cellule gliale est ainsi responsable d'un changement de fonction de l'autre type cellulaire et cette interaction entre la

microglie et les astrocytes semble fondamentale en cas d'agression (Jha et al. 2019; Qiao et Tiwari 2020).

C'est donc dans ce contexte que s'inscrit notre seconde étude. Le but est de mieux comprendre l'activation des cellules gliales lors d'un stimulus douloureux viscéral aigu, d'évaluer si cette activation persiste dans le temps, et de mettre en évidence l'interaction qui existe entre la microglie et les astrocytes dans ce même modèle de douleur.

B) Article 2 :Article en cours de reviewing

Activation of glial cells, production of TNF-alpha and interaction between microglia and astrocytes cells in a model of acute visceral pain in rats

Mouna Ben-Rehouma, MD ^{1,2}

Leila Hamdi ¹

Mickael Soued ¹

Jean-Xavier Mazoit MD, PhD ^{1,3}

Dan Benhamou, MD ^{1,3}

¹ Laboratoire d'Anesthésie, Paris-Saclay University and INSERM U1195 Faculté de Médecine de Bicêtre 63 Rue Gabriel Péri 94270 Le Kremlin-Bicêtre France

² Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, Hôpital Bichat, Hôpitaux Universitaires Paris-Nord, APHP

³ Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, Hôpital Bicêtre, Hôpitaux Universitaires Paris-Saclay, APHP, - 78, rue du Général Leclerc 94275 Le Kremlin Bicêtre Cedex France

Author for correspondence. Mouna Ben-Rehouma, Laboratoire d'Anesthésie, INSERM U1195 Faculté de Médecine de Bicêtre 63 Rue Gabriel Péri 94270 Le Kremlin-Bicêtre France

e-mail : mouna.ben-rehouma@aphp.fr

Conflicts of interest. None

Abstract: Glial cells (microglia and astrocytes) are actively involved in the integration of the pain message. However, their role in acute visceral pain is less known. The aim of this work was to evaluate the role of these cells in acute visceral pain, their activation kinetics and their interactions. In a rat model of acute visceral pain by intraperitoneal injection of carrageenan, we demonstrated a concomitant activation of microglia and astrocytes in the Central Nervous System, which was maximal at 24 hours and decreased from the 48th hour. Microglial inhibition by minocycline leads to astrocytic inhibition in the brainstem in the same pain model. Astrocytic inhibition by ceftriaxone does not alter microglial activity. Glial cells thus play a prominent role in the transmission and integration of the acute visceral pain message through their rapid and joint activation. They may be a therapeutic target in the treatment of visceral pain.

Key words: acute visceral pain, astrocytes, microglia, activation, inflammation.

Introduction

Glial cells which include microglia and astrocytes play a key role in different functions of the central nervous system (CNS). They maintain CNS homeostasis, protect against injury, and are a major determinant of communication between neurons (both in the spinal cord and the brain). Hence, different studies have revealed their involvement in different CNS diseases like epilepsy, Alzheimer's disease and development disorders such as autism³².

Recently, pain experiments in different animal models have shown the role played by glial cells in the integration of the pain message. Indeed, microglia and astrocytes are activated in different experimental models of pain. For example, Zhang et al demonstrated in an inflammatory model by injection of Freund's adjuvant in rats a significantly increased activity of both microglia and astrocytes³⁸. Another study compared this activation in two different models of pain: acute (paw incision) versus chronic (L5 nerve transection surgery) and showed an increased activity of glial cells in the spinal cord³¹. This activation is underlined by different studies using inhibitors. For example, intrathecal injection of minocycline (a microglial inhibitor) attenuates visceral hyperalgesia induced by intracolonic acid injection¹⁷ and intrathecal injection of ceftriaxone (an astrocyte inhibitor) alleviates tactile allodynia in a model of constrictive peripheral nerve chronic injury¹². Neuropathic pain studies also suggest that pain-induced microglial activation modulates astrocytic activity and leads to a chronic pain state in some cases^{37,91,522}.

Cellular mechanisms underlying the role of these cells in pain pathways begin to be understood. After peripheral nerve injury in rats (sciatic nerve ligation), astrocytic activation in the spinal cord induces a down-regulated activity of the GLT1 transporter on astrocyte membranes²⁸. In the same pain model, other authors demonstrated P2X4

receptor activation in microglial cells¹⁴. P2X7R up-regulation has also been demonstrated in spinal microglia using a rat model of chronic pancreatitis¹⁸. Modulation of TNF α activity by glial cells has been identified as a fundamental mechanism of neuronal plasticity and activity in neuropathic pain. Glial cell activation was indeed accompanied by TNF α release by microglial cells in an experimental neuropathic pain model¹⁹. Release of TNF α in the CNS by astrocytes has also been demonstrated in a different neuropathic pain models³⁹.

Mechanisms of visceral pain are less well understood than those involved in neuropathic pain. Integration of the painful message of visceral nociception is complex because nerve transmission is also mediated by the vagus nerve¹⁵. Nevertheless, a few studies have shown that glial cells are involved in visceral pain as well. Animal studies have shown an increased expression of proinflammatory cytokines and chemokines by glial cells in a visceral nociception model¹. Astrocytes also directly stimulated neuronal excitation by increasing ATP exocytosis in an animal model of visceral pain¹⁶. In a colonic inflammation experiment in mice, satellite glial cells (glial cells in sensory ganglia) were activated too¹⁰. Other studies showed that enteric glia (peripheral glia located in the enteric nervous system) was activated in different gut inflammation models²³.

However, many questions remain unresolved. Our hypothesis is that microglia and astrocyte activation participate in transmission of acute visceral pain in the CNS. The aim of this study was to examine the activation of microglia and astrocytes in an acute visceral pain model in rats. The time profile of activation of microglia and astrocytes was estimated by TNF α production and colocalization. The second objective was to examine the interaction between microglia and astrocytes by using inhibitors.

Methods

This experiment was performed in male Sprague-Dawley rats weighing 175 to 225 g (Elevage JANVIER, Le Genest-ST-Isle, France). Rats were housed at 22±2°C with food and water available ad libidum and maintained on a 12-hour light dark cycle. Ethical Approval for this study was provided by the Comité d’Ethique en Expérimentation Animale (CEEA 26, Paris SUD, N°18095). All experiments were performed according to the ARRIVE2 guidelines. All animals were acclimatized during ten days before the start of experiments. All procedures were performed under isoflurane anesthesia.

Drugs

Minocycline (Sigma-Aldrich) was dissolved in saline and injected intravenously (25mg/kg) or intraperitoneally (50 mg/kg). Ceftriaxone (Mylan) was dissolved in saline and injected intraperitoneally at a dose of 200mg/kg.

Procedures

Procedure # 1: Rats were randomly assigned to six groups (7-8 rats per group). Under isoflurane anesthesia, 3% carrageenan was administered intraperitoneally to five groups and saline was administered in the control group (H0). Rats were euthanized for immunostaining at 0 (H0), 2 (H2), 6 (H6), 24 (H24), 48 (H48) hours and at day 7 (D7). (Figure 1)

Procedure # 2: Rats were randomly assigned to three groups (9 rats per group). Under isoflurane anesthesia, minocycline (Mino), ceftriaxone (Ceftri) or saline (Perit) were injected one hour before intraperitoneal injection of 1mL of 3% carrageenan and rats were euthanized for immunostaining 24 hours after chemical peritonitis (H24). For all animals, behavioral testing using Von Frey Filament was applied one hour before Mino, Ceftri, or Perit injection and was repeated one hour before infusion for immunostaining.

The abdomen withdrawal threshold was assessed using an Electro-von Frey Aesthesiometer with a rigid plastic tip (BIOSEB, Bio-VF-M). The animals were habituated in a transparent Plexiglas box with a raised mesh grid bottom for 15–20 min. The tip of the device was then applied with an increasing force to the middle of the abdomen. A positive withdrawal response was defined as a rapid retraction of the abdomen away from the rigid tip. The abdomen withdrawal threshold was measured three times in each animal, with an interval of at least 3 min. The average of the three measurements was retained. All data were after translated in pressure (g/mm^2)⁷.(Figure 1)

Immunostaining

After the procedure, rats were deeply anesthetized with thiopental (30 mg/kg) intravenously and perfused intracardially with 4% paraformaldehyde in 0,6 -M phosphate buffer. The spinal cord from T11 to 13 and brainstem were removed and postfixed in the same fixative overnight. Serial transverse sections of 7- μm spinal cord slices and brainstem were cut and dried for 48 hours. After wax removal and rehydration, the sections were washed twice with 0.15-M phosphate buffer solution (PBS) solution and immersed in 2% H_2O_2 for 30 minutes. Sections were incubated for 20 hours at 4 °C with a mouse monoclonal antibody against CD11b/c (ab1211, Abcam) 1:100 or a mouse monoclonal antibody against GFAP (AMAB91033, Sigma-Aldrich) 1:500 and a rabbit polyclonal antibody against $\text{TNF}\alpha$ (ab66579, Abcam) 1:100. The sections were rinsed in PBS (3 times for 10 minutes each) and incubated with secondary antibodies (goat anti rabbit 1:1000 Alexa 555; A21428, Life technologies) and goat antimouse 1:1000 Alexa 488 (A11029, Life technologies) for 2 hours in the dark at room temperature. Sections were washed with PBS (3 times for 15 minutes each) and counterstained for 5 minutes

with 0.5- μ g/ mL 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich) and then rinsed in PBS for 5 minutes, air dried, and coverslipped using Glycergel (CO563, DAKO). Sections were observed with microscopy (Olympus BX61) and images were acquired at 20 \times and 40 \times . Quantification of the number of CD11b or GFAP positive cells in the superficial (I and II) and deep (V and VI) laminae of the dorsal horn was performed by two independent investigators blind to the experimental conditions with Image J program, and the average value was selected. Similarly, 4 sections of the brainstem passing by the nucleus solitary tract (NTS) and exhibiting the greatest number of labeled cells were equally selected, and the number of cells in the total nucleus was measured as above. For colocalization, we used JACoP in image J (Image J software) extension of the ImageJ software (National Institutes of Health; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) The number of cells with colocalized CD11b and TNF α and those with colocalized GFAP and TNF α were quantified similarly.

Statistical analysis

The number of animals required for each experiment was calculated considering a power of 80%, a two-tail alpha risk of 5% corrected for multiple comparisons. Because 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 specific between-group comparisons were performed only if necessary using the Mann-Whitney Test with the Dunn correction after the Kruskal–Wallis test. We used the Manders' coefficients M1 and M2 and the overlap coefficient (MOC) to assess the validity of the hypothesis of colocalization of TNF α with the integrin CD11b and the GFAP protein in the spinal cord and NTS⁴.

Results

Procedure # 1: Kinetics of activation of each cellular type and colocalization (Table 1, Figure 2)

One rat in the NTS group was excluded at D7 due to humane endpoint. No significant difference was observed between the two sides of the cord or the NTS. Data obtained on right and left sides were therefore averaged for further analysis. The M2 and MOC values were all excellent in all cuts (> 0.8) (Table 1). The gaussian distribution and the fact that the R and M1 coefficients were less good (often < 0.5) is simply explained by the fact that $\text{TNF}\alpha$ is secreted by both cell types, the astrocytic part is not explained when addressing microglia and vice versa.

In the spinal cord, the number of CD11b reactive cells increased significantly and the time to maximum (T_{max}) was obtained at 48h ($p=0.006$). For CD11b + $\text{TNF}\alpha$ reactive cells, T_{max} was obtained at 24h ($p=0.007$). In the NTS, the number of CD11b reactive cells increased significantly and T_{max} occurred at 24h ($p=0.03$), while CD11b + $\text{TNF}\alpha$ reactive cells increased similarly and T_{max} also occurred at 24h ($p=0.007$).

In the spinal cord, the number of GFAP reactive cells did not differ significantly at the different times studied. However, the number of GFAP + $\text{TNF}\alpha$ reactive cells increased significantly and T_{max} was obtained at 24h ($p= 0.008$). In the NTS, T_{max} for GFAP reactive cells and GFAP+ $\text{TNF}\alpha$ reactive cells were both reached at 24h ($p=0.006$ and $p=0.003$).

Procedure # 2: Microglia - astrocyte interaction (Figures 3 and 4)

One rat was missing in the Perit group because of anesthesia-related death.

Behavioral tests using Von Frey filaments demonstrated that the tolerated pressure decreased significantly between H0 and H24 ($p=0.0059$) in the Perit group. In the Ceftri group by contrast, the tolerated pressure increased significantly between H0 and H24 ($p=0.0059$). There was no significant difference in the Mino group (Figure 3).

No difference between the two sides of the cord or the NTS was observed. Data for the left and the right side were therefore averaged for analysis.

In the spinal cord, the use of minocycline or ceftriaxone did not change significantly the number of CD11b reactive cells but the use of minocycline decreased significantly the number of CD11b + TNF α reactive cells compared to the Perit group ($P=0.004$). In the NTS, neither minocycline nor ceftriaxone administration changed significantly the number of CD11b and CD11b+TNF α reactive cells compared to the Perit group.

In the spinal cord, the use of minocycline or ceftriaxone did not change significantly the number of GFAP reactive cells compared to the Perit group. The number of GFAP + TNF α reactive cells however decreased significantly compared to the Perit group in the Ceftri group ($p=0.001$). In the NTS, the use of minocycline and ceftriaxone significantly decreased the number of GFAP reactive cells compared to Perit group ($p=0.0010$). The number of GFAP+TNF α reactive cells decreased significantly compared to Perit group in the Mino group ($p=0.001$) and in the Ceftri group ($p=0.001$).

Discussion

The present study mainly showed that acute visceral injury leads to an increased number and activation of both microglial cells and astrocytes in the CNS, both at the level of the spinal cord and at the NTS level. This activation was demonstrated by TNF alpha colocalization in the two glial cell types and intensity of activation peaked at 24 hours for both cell types.

In a previous study³, we already described microglial cell activation with TNF α release after acute visceral injury using a colocalization method. An in vivo study underlined immediate microglia architectural modification after a change in brain homeostasis²⁰. This result has also been observed in studies investigating chronic visceral pain. Indeed, in a model of colitis in rats, upregulation of TNF-alpha release in the hippocampus was associated with an increase in microglial activation in the brain. Microglial activation in chronic visceral pain has led some authors to underline the potential connection with a potential therapeutic role²⁹.

Astrocyte activation has also been demonstrated in chronic visceral pain. After colonic inflammation induced by TNBS (Trinitrobenzene sulfonic acid) in rats, GFAP density was indeed significantly higher in the spinal cord after 3 days³⁵. In a model of murine pancreatic cancer inducing chronic visceral pain, both microglia and astrocyte cell activity significantly increased⁶. However, to our knowledge, astrocyte activation in acute visceral pain, as shown in the present study, is a new information. Moreover, the present study also demonstrated a change of the two glial cell type shape after activation. We observed that astrogliosis occurring in acute visceral pain was associated with cell body hypertrophy and an increased size of the processes (i.e. elongation). This morphological change has been described in other studies in case of drug-induced injury^{30,33}.

Regarding the timeline of activation, a parallel increase in microglia and astrocyte activity was observed at H2 and peaked at H24 and then gradually decreased progressively from the 48th hour. These data are the first that report on the time-related activation of glial cells in an acute visceral pain model. In a model of acute pain after plantar incision in the rat, both astrocytes and microglia were activated in the spinal cord but the significant increase in GFAP immunoreactivity was observed at 24h while OX-42 immunoreactivity, another marker of microglial activation, increased only on the third day ²⁵. Moreover, the increase of both OX-42 and GFAP immunoreactivity was maintained until the fifth day ²⁵. These results differ from our microglia data, but OX-42 immunoreactivity may be only one marker of cell activity. Other authors have indeed shown that P38 is activated very early (i.e.15 minutes) in spinal microglia ³⁶. These different observations suggest a different kinetics of activation of each marker in glial cells.

Although we could not demonstrate a modification of cell density by using inhibitors, minocycline decreased significantly the number of activated microglia in the spinal cord and activated astrocytes in the NTS whereas ceftriaxone decreased significantly the number of activated astrocytes both in the NTS and the spinal cord. These results suggest that microglia inhibition leads to astrocytic inhibition in the NTS whereas astrocyte inhibition does not change microglial activity. To our knowledge, it is the first time that the interaction between glial cells is analyzed in the NTS in an acute visceral pain model. Our results are similar to those obtained in neuropathic pain where microglia activation precedes astrocyte activation^{5,27}. However other studies are necessary to confirm these observations obtained in visceral acute pain.

Moreover, we failed to show a change in microglial density or activity by the use of minocycline in the NTS. This is most likely due to a lack of power of the study. It is

unclear if it is also a molecule-related problem. On one hand, inhibition at the cerebral level was effective in our murine model and this in agreement with data showing that minocycline can cross the blood-brain barrier⁸. Whether minocycline can be effective when administered systemically is controversial. Data obtained in a model of carrageenan-induced paw inflammation in rats were similar to ours since P38 microglia immunoreactivity in the spinal cord was not modified after systemic minocycline injection but was decreased after intrathecal minocycline injection¹³. Similarly, a clinical study using orally administered minocycline before and after lumbar discectomy for chronic radicular low back pain also did not show any pain relief²¹. By contrast, in a rat model of streptozotocin-induced diabetes, intraperitoneally chronic administration of minocycline at 40 and 80 mg/kg attenuated the development of diabetic neuropathy²⁶. Contradictions therefore remain in the literature regarding the efficacy of minocycline according to its route of administration in various pain states.

The present study demonstrated that systemically administered ceftriaxone was effective in this model of acute visceral pain. These results are consistent with those showing analgesic efficacy of ceftriaxone in another acute visceral pain model (i.e. intraperitoneal acetic acid injection in mice)³⁴ and in a chronic visceral pain¹¹. Ceftriaxone efficacy has also been studied in different experimental neuropathic pain models and is probably mediated by an increase in the number of GLT1 (Glutamate Transporter 1) receptors on astrocyte membrane^{24,40} which increases the reuptake of glutamate and therefore decreases the excitatory activity of astrocytic cells. Furthermore, we demonstrated for the first time a TNF α release in the NTS by astrocytes in acute visceral pain injury, while it was established in an in vitro model that modulation of astrocyte TNF α release in the synaptic gap generates a change in synaptic plasticity and

response to neural injury². These different results suggest the importance of astrocytic activation in pain.

In conclusion, in a murine model of acute visceral pain, microglia and astrocytes are both activated promptly after acute visceral injury. Microglia activation might slightly precede and be necessary for astrocyte activation in the NTS. Given the difficulty to relieve effectively acute visceral pain, it appears that these cells may be a therapeutic target which needs to be further explored.

Acknowledgments: We thank Larbi AMAZIT, PhD, UMS 44, INSERM, Institut Biomedical du Val De Bièvre, 94276, Le Kremlin Bicêtre, for image processing.

References

1. Basso L, Lapointe TK, Iftinca M, Marsters C, Hollenberg MD, Kurrasch DM, Altier C: Granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF) signaling in spinal microglia drives visceral sensitization following colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:11235–40, 2017.
2. Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Von Zastrow M, Beattie MS, Malenka RC: Control of synaptic strength by glial TNFalpha. *Science* 295:2282–5, 2002.
3. Ben Rehouma M, Kfoury T, Hamdi L, Bouchouareb M, Soued M, Benhamou D, Mazoit JX: Acute Visceral Pain in Rats: Vagal Nerve Block Compared to Bupivacaine Administered Intramuscularly. *Anesth Analg* 133:1311–20, 2021.
4. Bolte S, Cordelières FP: A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224:213–32, 2006.
5. Colburn RW, DeLeo JA, Rickman AJ, Yeager MP, Kwon P, Hickey WF: Dissociation of microglial activation and neuropathic pain behaviors following peripheral nerve injury in the rat. *J Neuroimmunol* 79:163–75, 1997.
6. Demir IE, Tieftrunk E, Schorn S, Saricaoglu ÖC, Pfitzinger PL, Teller S, Wang K, Waldbaur C, Kurkowski MU, Wörmann SM, Shaw VE, Kehl T, Laschinger M, Costello E, Algül H, Friess H, Ceyhan GO: Activated Schwann cells in pancreatic cancer are linked to analgesia via suppression of spinal astroglia and microglia. *Gut* 65:1001–14, 2016.
7. Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I: Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Front Mol Neurosci* 10:284, 2017.
8. Garrido-Mesa N, Zarzuelo A, Gálvez J: Minocycline: far beyond an antibiotic. *Br J Pharmacol* 169:337–52, 2013.
9. Gosselin R-D, Suter MR, Ji R-R, Decosterd I: Glial cells and chronic pain. *Neurosci Rev J Bringing Neurobiol Neurol Psychiatry* 16:519–31, 2010.
10. Hanani M: Role of satellite glial cells in gastrointestinal pain. *Front Cell Neurosci* 9:412, 2015.

11. Holschneider DP, Wang Z, Chang H, Zhang R, Gao Y, Guo Y, Mao J, Rodriguez LV: Ceftriaxone inhibits stress-induced bladder hyperalgesia and alters cerebral micturition and nociceptive circuits in the rat: A multidisciplinary approach to the study of urologic chronic pelvic pain syndrome research network study. *Neurourol Urodyn* 39:1628–43, 2020.
12. Hu Y, Li W, Lu L, Cai J, Xian X, Zhang M, Li Q, Li L: An anti-nociceptive role for ceftriaxone in chronic neuropathic pain in rats. *Pain* 148:284–301, 2010.
13. Hua X-Y, Svensson CI, Matsui T, Fitzsimmons B, Yaksh TL, Webb M: Intrathecal minocycline attenuates peripheral inflammation-induced hyperalgesia by inhibiting p38 MAPK in spinal microglia. *Eur J Neurosci* 22:2431–40, 2005.
14. Inoue K: Purinergic systems in microglia. *Cell Mol Life Sci CMLS* 65:3074–80, 2008.
15. Ji R-R, Berta T, Nedergaard M: Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain* 154 Suppl 1:S10–28, 2013.
16. Ji R-R, Chamesian A, Zhang Y-Q: Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. *Science* 354:572–7, 2016.
17. Kannampalli P, Pochiraju S, Bruckert M, Shaker R, Banerjee B, Sengupta JN: Analgesic effect of minocycline in rat model of inflammation-induced visceral pain. *Eur J Pharmacol* 727:87–98, 2014.
18. Liu P-Y, Lee I-H, Tan P-H, Wang Y-P, Tsai C-F, Lin H-C, Lee F-Y, Lu C-L: P2X7 Receptor Mediates Spinal Microglia Activation of Visceral Hyperalgesia in a Rat Model of Chronic Pancreatitis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 1:710-720.e5, 2015.
19. Liu Y, Zhou L-J, Wang J, Li D, Ren W-J, Peng J, Wei X, Xu T, Xin W-J, Pang R-P, Li Y-Y, Qin Z-H, Murugan M, Mattson MP, Wu L-J, Liu X-G: TNF- α Differentially Regulates Synaptic Plasticity in the Hippocampus and Spinal Cord by Microglia-Dependent Mechanisms after Peripheral Nerve Injury. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 37:871–81, 2017.
20. Lu C-L: Spinal microglia: A potential target in the treatment of chronic visceral pain. *J Chin Med Assoc JCMA* 77:3–9, 2014.
21. Martinez V, Szekely B, Lemarié J, Martin F, Gentili M, Ben Ammar S, Lepeintre JF, Garreau de Loubresse C, Chauvin M, Bouhassira D, Fletcher D: The efficacy of a

- glial inhibitor, minocycline, for preventing persistent pain after lumbar discectomy: a randomized, double-blind, controlled study. *Pain* 154:1197–203, 2013.
22. Milligan ED, Watkins LR: Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 10:23–36, 2009.
 23. Morales-Soto W, Gulbransen BD: Enteric Glia: A New Player in Abdominal Pain. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 7:433–45, 2019.
 24. Nie H, Zhang H, Weng HR: Minocycline prevents impaired glial glutamate uptake in the spinal sensory synapses of neuropathic rats. *Neuroscience* 170:901–12, 2010.
 25. Obata H, Eisenach JC, Hussain H, Bynum T, Vincler M: Spinal glial activation contributes to postoperative mechanical hypersensitivity in the rat. *J Pain* 7:816–22, 2006.
 26. Pabreja K, Dua K, Sharma S, Padi SSV, Kulkarni SK: Minocycline attenuates the development of diabetic neuropathic pain: possible anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms. *Eur J Pharmacol* 661:15–21, 2011.
 27. Raghavendra V, Tanga F, DeLeo JA: Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther* 306:624–30, 2003.
 28. Ramos KM, Lewis MT, Morgan KN, Crysdale NY, Kroll JL, Taylor FR, Harrison JA, Sloane EM, Maier SF, Watkins LR: Spinal upregulation of glutamate transporter GLT-1 by ceftriaxone: therapeutic efficacy in a range of experimental nervous system disorders. *Neuroscience* 169:1888–900, 2010.
 29. Riazi K, Galic MA, Kuzmiski JB, Ho W, Sharkey KA, Pittman QJ: Microglial activation and TNFalpha production mediate altered CNS excitability following peripheral inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:17151–6, 2008.
 30. Robinson CR, Zhang H, Dougherty PM: Astrocytes, but not microglia, are activated in oxaliplatin and bortezomib-induced peripheral neuropathy in the rat. *Neuroscience* 274:308–17, 2014.
 31. Romero-Sandoval A, Chai N, Nutile-McMenemy N, Deleo JA: A comparison of spinal Iba1 and GFAP expression in rodent models of acute and chronic pain. *Brain Res* 1219:116–26, 2008.

32. Salter MW, Stevens B: Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med* 23:1018–27, 2017.
33. Sofroniew MV, Vinters HV: Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol (Berl)* 119:7–35, 2010.
34. Stepanovic-Petrovic RM, Micov AM, Tomic MA, Kovacevic JM, Boškovic BD: Antihyperalgesic/antinociceptive effects of ceftriaxone and its synergistic interactions with different analgesics in inflammatory pain in rodents. *Anesthesiology* 120:737–50, 2014.
35. Sun Y-N, Luo J-Y, Rao Z-R, Lan L, Duan L: GFAP and Fos immunoreactivity in lumbo-sacral spinal cord and medulla oblongata after chronic colonic inflammation in rats. *World J Gastroenterol* 11:4827–32, 2005.
36. Svensson CI, Marsala M, Westerlund A, Calcutt NA, Campana WM, Freshwater JD, Catalano R, Feng Y, Protter AA, Scott B, Yaksh TL: Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia is a critical link in inflammation-induced spinal pain processing. *J Neurochem* 86:1534–44, 2003.
37. Tsuda M, Koga K, Chen T, Zhuo M: Neuronal and microglial mechanisms for neuropathic pain in the spinal dorsal horn and anterior cingulate cortex. *J Neurochem* 141:486–98, 2017.
38. Zhang J, Deng X: Bupivacaine effectively relieves inflammation-induced pain by suppressing activation of the NF- κ B signalling pathway and inhibiting the activation of spinal microglia and astrocytes. *Exp Ther Med* 13:1074–80, 2017.
39. Zheng W, Ouyang H, Zheng X, Liu S, Mata M, Fink DJ, Hao S: Glial TNF α in the spinal cord regulates neuropathic pain induced by HIV gp120 application in rats. *Mol Pain* 7:40, 2011.
40. Zimmer ER, Parent MJ, Leuzy A, Aliaga A, Aliaga A, Moquin L, Schirmacher ES, Soucy J-P, Skelin I, Gratton A, Gauthier S, Rosa-Neto P: Imaging in vivo glutamate fluctuations with [(11)C]ABP688: a GLT-1 challenge with ceftriaxone. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 35:1169–74, 2015.

Figure 1: Experimental groups

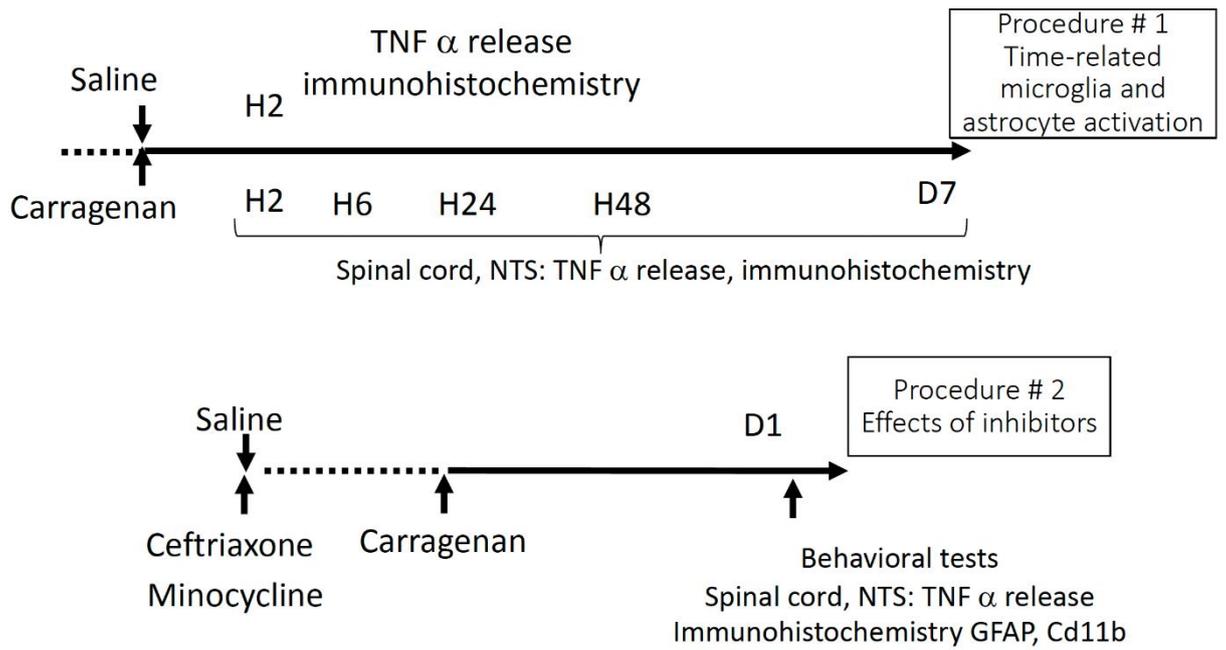
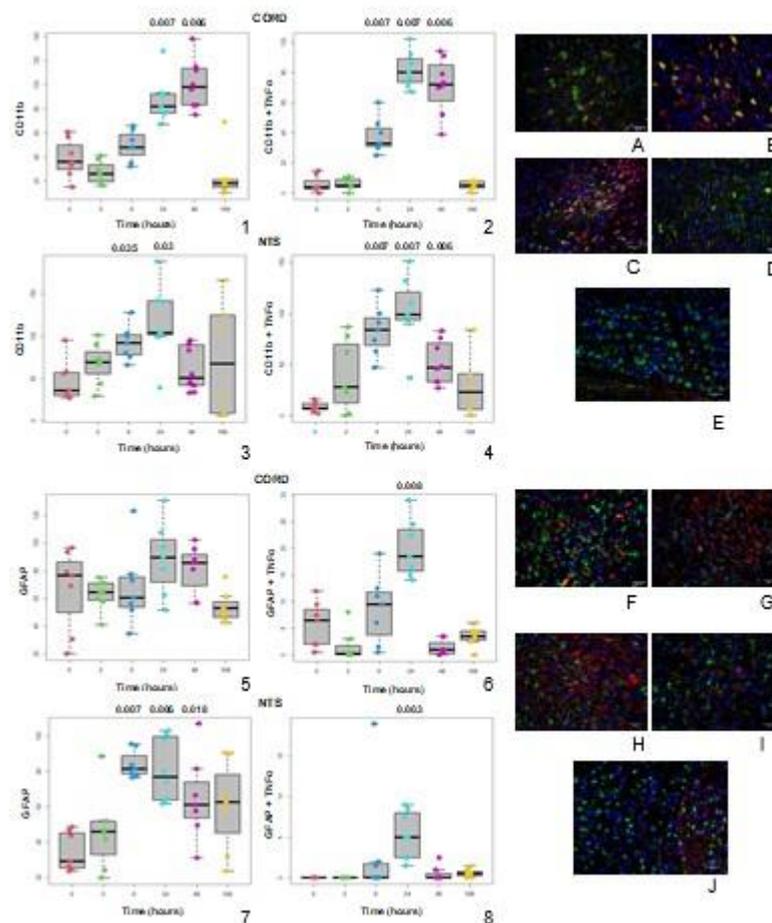


Table 1: Values of the linear correlation coefficient, Manders coefficient M1 and M2 and the overlap coefficient measured in the marrow for microglia (CD11b) at different times.

<u>times (hours)</u>	R	MOC	M1	M2
0	0.378	0.942	0.416	0.852
2	0.442	0.944	0.428	0.844
6	0.403	0.904	0.309	0.865
24	0.413	0.948	0.496	0.862
48	0.382	0.948	0.497	0.852
168	0.420	0.939	0.537	0.884

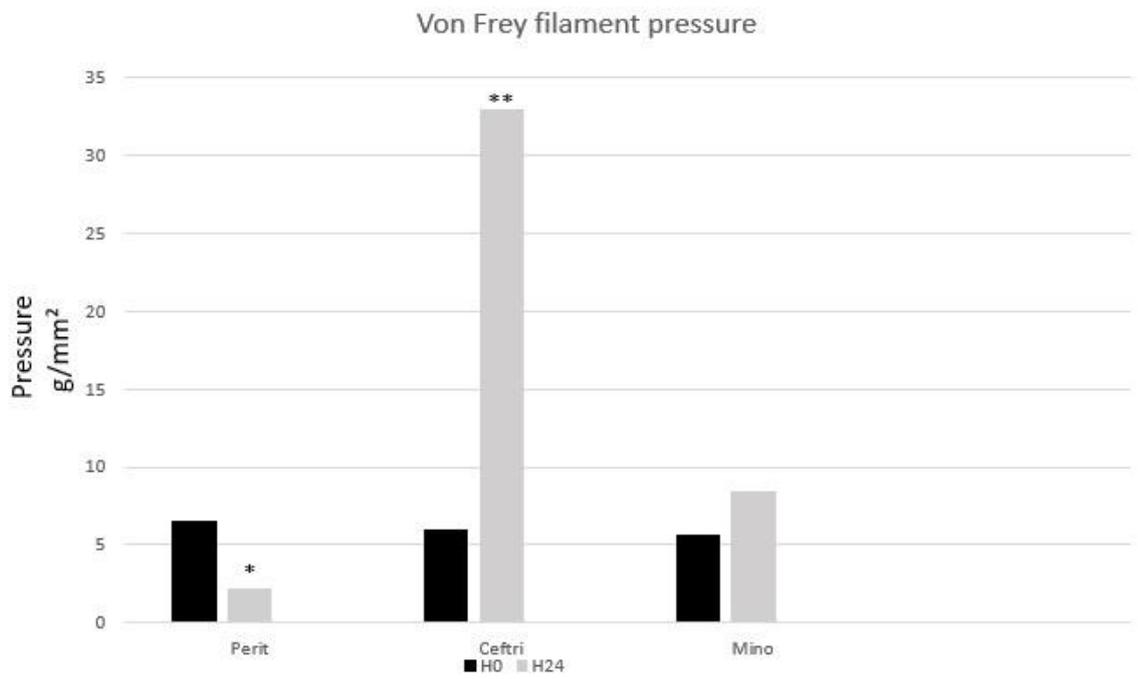
Abbreviations: R, the linear correlation coefficient; MOC, the overlap coefficient, M1, Manders' coefficient M1; M2, Manders' coefficient M2.

Figure 2: Kinetics of activation of CD11b, CD11b + TNF α , GFAP and GFAP+TNF α reactive cells in the cord and the NTS.



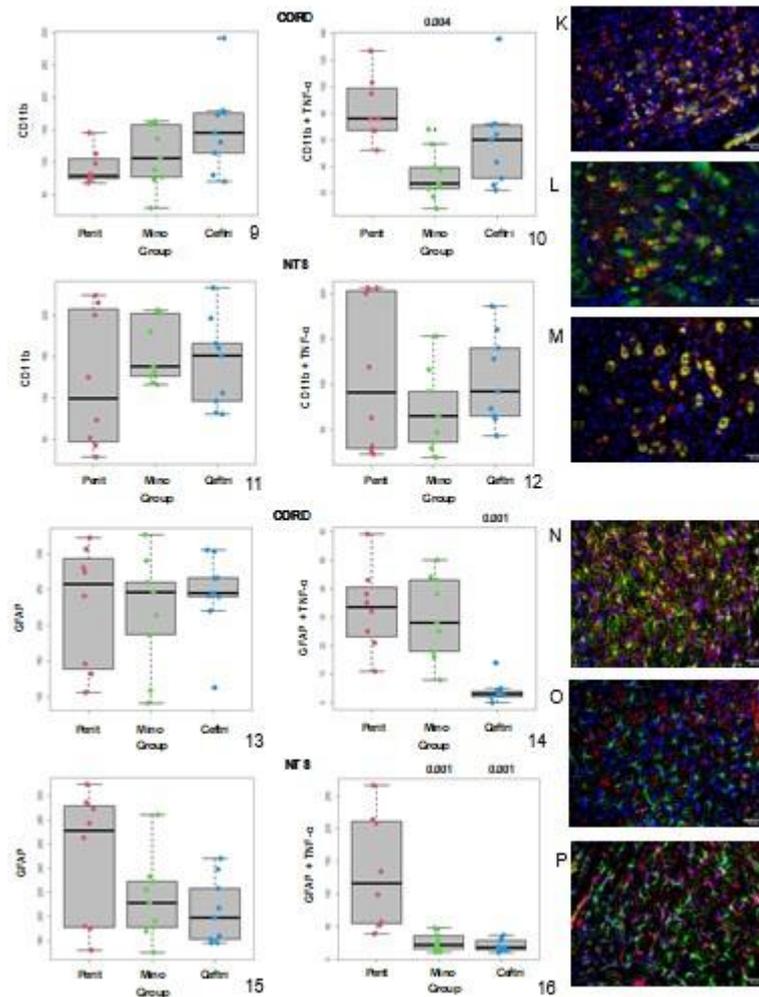
Box plots representing the number of CD11b (1) and CD11b + TNF α (2) reactive cells at 0, 2, 6, 24, 48, and 168 hours (D7) in the spinal cord, the number of CD11b (3) and CD11b + TNF α (4) reactive cells at 0, 2, 6, 24, 48, and 168 hours in the NTS. Box plots representing the number of GFAP (5) and GFAP + TNF α (6) reactive cells at 0, 2, 6, 24, 48, and 168 hours in the cord, the number of GFAP (7) and GFAP + TNF α (8) reactive cells at 0, 2, 6, 24, 48, and 168 hours in the NTS. Boxes are median and 25-75 percentiles, bars are 10-90 percentiles and dots are outliers. Microglia activation in the NTS at H2(A), H6 (B), H24 (C), H48(D) and D7 (E). Astrocyte activation in the NTS at H2 (F), H6 (G), H24 (H), H48 (I) and D7 (J). CD11b cells or GFAP cells are stained in green, DAPI staining identifies nuclei in blue, and TNF α is stained in red. CD11b + TNF or GFAP+TNF α colocalization are stained in yellow. Scale (white bar) is 50 μ m.

Figure 3. Von Frey filament pressure (g/mm²) in Peritonitis group (Perit group); Ceftriaxone group (Ceftri), Minocycline group (Mino).



*p=0.0059 between H0 and H24 in the Perit group, **p=0.0059 between H0 and H24 in the Ceftri group.

Figure 4. Interaction between microglia and astrocytes after using minocycline and ceftriaxone.



Number of CD11b reactive cells (9) and number of CD11b+ TNF α reactive cells (10) in the cord in the peritonitis group (Perit), Ceftriaxone group (Ceftri) and Minocycline group (Mino). Number of CD11b reactive cells (11) and number of CD11b+TNF α (12) in the NTS for the Perit, Ceftri and Mino group. Number of GFAP reactive cells (13) and number of GFAP+ TNF α reactive cells (14) in the cord in the Perit group, Ceftri group and Mino group. Number of GFAP reactive cells (15) and number of GFAP+ TNF α reactive cells (16) in the NTS in peritonitis group (Per), Ceftriaxone group (Ceftri), Minocycline group (Mino). Boxes are median and 25 to 75 percentiles, bars are 10 to 90 percentiles and dots are outliers. Microglia activation in the NTS in the Perit group (K), the Mino group (L) and the Ceftri group (M). Astrocytes activation in the NTS in the Perit group (N), the Mino group (O) and the Ceftri group (P). CD11b cells or GFAP cells are stained in green, DAPI staining identifies nuclei in blue, and TNF α

is stained in red. CD11b + TNF or GFAP+TNF α colocalization are stained in yellow. Scale (white bar) is 50 μ m.

C) Discussion des résultats de l'article :

Notre étude a permis de mettre en évidence une activation rapide, concomitante et disparaissant en moins de 48h de la microglie et des cellules astrocytaires dans notre modèle de douleur viscérale aigue.

Ces résultats confirment la réponse précoce des cellules gliales lors d'une agression. Nous mettons aussi en évidence que l'activation astrocytaire est tout aussi rapide que l'activation microgliale dans ce modèle de douleur. On peut penser que ce résultat est contradictoire avec la littérature qui rapporte une activation microgliale responsable de l'activation astrocytaire, mais il faut garder en tête que l'activation astrocytaire est aussi médiée par les modifications de l'activité neuronale. En effet, les astrocytes sont très proches des neurones, et pour mémoire un astrocyte est au contact de 3 à 4 corps cellulaires neuronaux et proche de plusieurs centaines de dendrites. C'est pourquoi l'activité neuronale par la sécrétion de différents neuromédiateurs lors d'agression pourrait influencer très rapidement l'activité astrocytaire (Ren et Dubner 2008).

Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'interaction entre les astrocytes et la microglie au niveau de la moelle épinière. Ce résultat s'explique par l'absence d'efficacité de notre inhibiteur (minocycline) sur la microglie au niveau médullaire. Des compléments de travaux sont nécessaires pour étudier cette interaction à ce niveau. En revanche, il a bien été mis en évidence une interaction entre les cellules microgliales et astrocytaires au niveau cérébral puisque l'utilisation de la minocycline diminue aussi bien le nombre que l'activité des astrocytes dans le NTS. Ce résultat souligne le rôle primordial de la microglie dans l'astrocytose et sont concordants avec les données de la littérature. En effet, il a été démontré que la microglie à travers la sécrétion de neurotransmetteurs influe sur la modification d'activité astrocytaire soit en redistribuant vers le phénotype A1 (phénotype proinflammatoire) dont l'effet est délétère sur les synapses soit en redistribuant vers le phénotype A2 (phénotype antiinflammatoire) dont l'effet est neuroprotecteur (Jang et al. 2013; Shinozaki et al. 2017). L'ensemble de ces différentes cellules (cad le neurone, la microglie, l'astrocyte) forment une unité fonctionnelle très riche sur le plan de la communication appelée « the tetrapartite synapse » (De Leo,

Tawfik, et LaCroix-Fralish 2006). Afin de mieux appréhender le rôle des cellules gliales dans la douleur viscérale aigue et leur interaction, il serait intéressant pour aller plus loin en étudiant les mécanismes intracellulaires mis en jeu lors du stimulus douloureux. Comment se comporte la voie des MAP kinases ? Alors que nous avons mis en évidence un effet inhibiteur de la bupivacaïne sur les cellules microgliales aussi bien au niveau médullaire qu'au niveau du NTS, il serait intéressant pour prolonger nos travaux en évaluant l'effet des anesthésiques locaux sur les astrocytes.

IV) Discussion générale et perspectives :

On peut se demander quel est l'intérêt de décortiquer ainsi le processus d'intégration du message douloureux viscéral aigu. Il s'agit en fait d'une nécessité du fait des problématiques liées à la douleur viscérale. En effet, la douleur viscérale est un problème majeur de santé publique et pose une réelle difficulté thérapeutique. La difficulté diagnostique et les errements thérapeutiques sont responsables d'un surcoût non négligeable (Costanza, Longstreth, et Liu 2004). Les cliniciens sont moins bien formés au diagnostic des douleurs viscérales du fait de la complexité de l'intégration du message douloureux (Shian et Larson 2018). Ainsi comme souligné plus haut, la douleur viscérale engendre des répercussions négatives devant le non soulagement de ces symptômes avec une chronicisation décrite dans près de la moitié des cas, un retentissement émotionnel avec parfois un syndrome dépressif secondaire et une interférence avec les fonctions cognitives supérieures (Kleine-Borgmann et al. 2021). Par conséquent, nous sommes convaincus qu'une connaissance meilleure de l'intégration du message douloureux viscéral aigu permettra d'améliorer la prise en charge clinique des patients au quotidien.

Ainsi au terme de ces quatre années, l'ensemble de notre travail a permis de souligner :
(cf. : tableau 5)

- le rôle des cellules microgliales et des cellules astrocytaires du SNC dans la transmission et l'intégration du message douloureux viscéral aigu.

-La cinétique d'activation des cellules gliales et la production de TNF-alpha lors de cette activation.

- L'interaction entre les cellules microgliales et les cellules astrocytaires dans le noyau du tractus solitaire lors de la transmission du message douloureux viscéral aigu.
- et l'influence des anesthésiques locaux dans la douleur viscérale par diminution de l'activité des cellules microgliales et de la synthèse de TNF-alpha dans le SNC.

Il existe donc une activation rapide et concomitante des cellules gliales après stimulation viscérale aiguë qui disparaît pratiquement à la 48^{ème} heure dans notre modèle utilisant l'injection intrapéritonéale de carragénine. Nous avons pu aussi observer une inhibition des cellules astrocytaires en cas d'inhibition microgliale au niveau du tractus du noyau solitaire. D'autre part nous avons aussi souligné l'action directe des anesthésiques locaux sur les cellules microgliales par la diminution de la synthèse de TNF-alpha aussi bien au niveau médullaire que dans le tronc cérébral. Ces résultats sont novateurs car il n'existe pas à notre connaissance dans la littérature d'autres études expérimentales avec lesquelles nous pouvons les comparer. D'autres travaux méritent d'être réalisés sur ce domaine afin de pouvoir les conforter et les étendre. Tous ces éléments sont fondamentaux pour la continuité des travaux que nous souhaitons poursuivre dans le laboratoire.

Le but de l'ensemble des études expérimentales est de trouver des nouvelles cibles thérapeutiques dans la lutte contre la douleur viscérale chez l'Homme. L'ensemble de ces études insistent sur un point fondamental, cad la faible efficacité des molécules utilisées en pratique courante aussi bien dans la douleur viscérale aiguë que dans la douleur viscérale chronique. Cette observation est bien mise en évidence dans une revue de la littérature (Chen, Ilham, et Feng 2017) qui reprend les catégories de molécules utilisées couramment dans la pratique clinique dans la douleur viscérale : les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les morphiniques et leurs dérivés, les benzodiazépines, les antidépresseurs tricycliques et les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine. Les auteurs mettent alors en évidence leur efficacité partielle voire l'absence d'efficacité, et surtout la survenue d'effets indésirables lors d'utilisation prolongée. Les auteurs émettent alors cette conclusion que nous partageons : il est fondamental d'utiliser des molécules les plus spécifiques possibles dans le traitement de tout type de douleur et notamment dans la douleur viscérale. C'est seulement en se focalisant sur des cibles très spécifiques que le traitement sera efficace en diminuant le risque d'effet secondaire.

Cependant, il existe dans notre arsenal thérapeutique une classe pharmacologique dont l'efficacité sur la douleur viscérale a été démontrée à plusieurs reprises en clinique : il s'agit des anesthésiques locaux. Les anesthésiques locaux ont trouvé leur place dans le traitement de la douleur chronique, par exemple en améliorant la symptomatologie des patients souffrant de maladie inflammatoire chronique de l'intestin lors d'application topique d'anesthésique local par voie rectale (Verne et al. 2003) Les anesthésiques locaux ont aussi montré leur efficacité dans la douleur viscérale aiguë notamment postopératoire dans plusieurs études cliniques. L'amélioration des symptômes douloureux et le rétablissement postopératoire significativement plus rapide ont été mis en évidence dans plusieurs modèles de douleur viscérale aiguë, tels que lors d'infiltration ou d'injection intrapéritonéale pour la chirurgie coelioscopique abdominale (Kahokehr et al. 2011; Protic et al. 2017). La réalisation de bloc de paroi a aussi montré un intérêt dans différents types de procédures abdominales avec une diminution de la consommation postopératoire d'opioïdes, une diminution de la symptomatologie douloureuse et un rétablissement physiologique significativement plus rapide. Cet apport a aussi été mis en évidence pour le Transversus Abdominis Plane block (TAP block), consistant à une infiltration périnerveuse échoguidée des racines de T6 à L1 et confirmé par plusieurs travaux repris dans une méta-analyse (Ma et al. 2017). D'autres infiltrations ont été décrites et ont aussi montré leur apport dans la prise en charge des patients au décours de différents types de chirurgie abdominale tels que le bloc des érecteurs du rachis (infiltration du rameau postérieur du nerf spinal) (De Cassai et al. 2019). Il a été démontré une diminution de la mortalité de manière significative lors de réalisation de péridurale pour la prise en charge des pancréatites aiguës graves en réanimation (Jabaudon et al. 2018) L'administration par voie systémique a aussi montré son efficacité dans la prise en charge des patients pour chirurgie abdominale dans le cadre du cancer colorectal (Herroeder et al. 2007). Par l'analyse de l'ensemble de cette littérature, nous avons donc constaté un réel apport des anesthésiques locaux dans la douleur viscérale aiguë dans la pratique clinique. Cette efficacité est contradictoire avec la quasi absence de données sur les mécanismes d'action des anesthésiques locaux dans la douleur viscérale aiguë. Nous avons bien pris en compte le fait que l'efficacité des anesthésiques locaux (quel que soit leur mode d'administration, et notamment par voie systémique) passe par des mécanismes multiples et n'est donc pas seulement médiée par le blocage des canaux sodiques des nerfs périphériques. En mettant en parallèle avec la littérature, nous avons pu constater

qu'un effet sur les cellules microgliales a déjà été décrit dans des études expérimentales (voir présentation de l'article 1, Toda et al, 2011 ; Yuan et al, 2014). Notre première étude expérimentale a permis de confirmer pour la première fois l'effet des anesthésiques locaux sur les cellules microgliales dans le NTS dans un modèle de douleur viscérale aigue. D'autre part l'action des anesthésiques locaux sur les cellules astrocytaires a fait l'objet de quelques études. Ainsi il a été démontré que la sécrétion de TNF-alpha et de IL-1 β diminuait significativement lorsque des astrocytes en culture sont mis en contact avec de la lidocaïne (Yuan et Fei 2021). De plus, la même étude a mis en évidence que le mécanisme d'autophagie des astrocytes est augmenté en présence de lidocaïne, conduisant à une diminution de la transmission du message douloureux. Dans une autre étude in vitro, il a été mis en évidence qu'un métabolite de la lidocaïne, le MEGX (monoethylglycinexylidide) inhibe la recapture de la glycine (neurotransmetteur inhibiteur) par GlyT1 (Glycine Transporter 1) présent sur la membrane des cellules astrocytaires (Werdehausen et al. 2012). L'ensemble de ces travaux montre que les anesthésiques locaux jouent un rôle inhibiteur potentiellement important sur l'activité gliale. Nous souhaitons donc aller plus loin dans l'analyse de l'effet des anesthésiques locaux par deux nouveaux axes de travail :

- Évaluer l'effet inhibiteur des anesthésiques locaux sur les cellules astrocytaires en mesurant la synthèse de cytokines pro inflammatoires telles que TNF-alpha dans notre modèle de douleur viscérale aigue.
- Etudier plus en détail cet effet inhibiteur par l'analyse de plusieurs voies de signalisation, notamment celle intégrant P38 (la voie des MAP kinases) et l'effet sur GlyT1.

D'autres études mécanistiques seraient également intéressantes. Ainsi plusieurs modèles d'inflammation colique ont mis en évidence le rôle de la protéine S100 calcium-binding protein β (S100 β) produite par les astrocytes entériques lors d'un stimulus inflammatoire entraînant la mort des cellules neuronales. Le couplage de S100 β et de la protéine RAGE (Receptor for Advanced Glycation End products), récepteur multiligands de la surface cellulaire modifie l'architecture de la membrane épithéliale colique et altère l'homéostasie de la muqueuse colique (Capoccia et al. 2015; Costa et al. 2019). La modulation du taux de glutamate au niveau du SNC dans des modèles de douleur neuropathique et viscérale modifie aussi l'intégration du message

douloureux. L'amélioration de la recapture du glutamate par l'utilisation de la minocycline dans un modèle de douleur neuropathique (ligature du nerf sciatique chez le rat) améliore la symptomatologie douloureuse (Nie, Zhang, et Weng 2010). Il existe aussi une diminution de la sensibilité au stimuli douloureux viscéral aigu par rapport au groupe contrôle dans un modèle de souris transgénique avec surexpression des récepteurs astrocytaires de recapture du glutamate (Lin et al. 2009).

D'autres études se sont attachées à chercher des cibles au niveau neuronal. Ainsi, le récepteur TRPV1 (Transient Receptor Potentiel Vanilloïd 1) a été retrouvé sur les fibres nerveuses afférentes myélinisées et non myélinisées du système digestif. Chez le rat, l'inhibition de ce récepteur par l'utilisation d'antagonistes diminue le ressenti douloureux (Holzer 2008). Dans un modèle de douleur viscérale chronique, l'utilisation d'un inhibiteur de TRPV1 (la miltefosine) entraîne l'amélioration de la symptomatologie douloureuse et l'amélioration des symptômes (Botschuijver et al. 2019).

Plusieurs molécules ont fait l'objet d'essais cliniques chez l'Homme. La prégabaline est l'une d'elles ; cette molécule bloque la sous unité alpha-2-delta des canaux Ca^{2+} dépendants et diminue la libération des neurotransmetteurs excitateurs tels que le glutamate. Elle a été utilisée pour soulager la douleur neuropathique. Certaines études cliniques ont évalué son efficacité dans la douleur viscérale. Cette molécule a montré son efficacité dans 2 types de douleur viscérale chronique : la pancréatite chronique (Olesen et al. 2011) et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Saito et al. 2019). Cette molécule a aussi été étudiée chez les parturientes lors de l'entrée en salle de naissance dans un essai randomisé. Les auteurs ont mis en évidence une diminution significative des doses de ropivacaïne chez les parturientes prémédiquées par la prégabaline avant la mise en place de l'analgésie péridurale (Lavand'homme et Roelants 2010). Une autre molécule a aussi été étudiée en clinique ; il s'agit de l'asimadoline qui est un agoniste spécifique des récepteurs κ opioïdes présents en grande quantité au niveau du système nerveux innervant le tube digestif. Les résultats sont pour l'instant variables d'une étude clinique à une autre sur la douleur viscérale chronique et d'autres études de plus grande échelle sont nécessaires (Camilleri 2008; Delvaux et al. 2004). D'autres auteurs ont essayé de reproduire les résultats obtenus dans des modèles animaux chez l'homme dans des essais cliniques. Il en va ainsi de la minocycline, puissant inhibiteur de la microglie aussi bien in vitro que dans plusieurs modèles de

douleur chez le rat et la souris. Malheureusement, cet antibiotique n'a pas eu les effets escomptés sur l'amélioration des symptômes douloureux dans les essais cliniques de douleur neuropathique (Vanelderren et al. 2015; Curtin et al. 2017). A notre connaissance, il n'existe pas à ce jour d'étude clinique évaluant l'efficacité de la minocycline sur la douleur viscérale aussi bien dans sa forme aigue que chronique. Le champ thérapeutique est donc pour l'instant encore vierge de molécules dont l'efficacité sur la douleur viscérale donnerait lieu à des recommandations de grade élevé. Afin d'améliorer cette connaissance, nous avons pour but de poursuivre notre expérimentation afin d'évaluer leur intérêt thérapeutique dans la prise en charge de la douleur viscérale aigue.

Nous souhaitons poursuivre nos travaux sur les cellules gliales dans un modèle de douleur viscérale chronique que nous avons mis au point. Nous avons observé que dans notre modèle de stimulation viscérale aigue l'activité des cellules gliales s'éteint en 48 H, alors que celle-ci persiste dans différents modèles de douleur chronique qu'elle soit neuropathique ou viscérale. Ces résultats suggèrent que dans la douleur chronique il existe une activation persistante des cellules gliales et que cette activation pourrait jouer un rôle dans la chronicisation de la douleur (Ji, Berta, et Nedergaard 2013). Existe-t-il une modification de l'activité des cellules gliales et cette modification est-elle similaire dans les deux types de cellules gliales ? Cette activation astrocytaire et microgliale persiste-t-elle de manière similaire dans le temps ? Y a-t-il un rôle des cellules gliales entériques dans la chronicisation ?

Enfin, nous souhaiterions aussi poursuivre nos travaux sur un versant thérapeutique aussi bien avec les anesthésiques locaux mais aussi avec d'autres molécules. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle des MAP kinases dans l'intégration du message douloureux au niveau du SNC. Ainsi au niveau neuronal, les MAP kinases activées par leur phosphorylation modifient l'activité des récepteurs TRPV1 et Transient Receptor Potential cation channel subfamily A member 1 (TRPA1) sensibles au stress et au stimulus douloureux. Au niveau microglial, la phosphorylation des P38 MAP kinases augmente la libération des cytokines proinflammatoires par ces cellules. Du fait de cette activité, les études expérimentales se sont très vite intéressées au rôle des MAP kinases dans la douleur et leur rôle a été bien mis en évidence dans la douleur neuropathique et inflammatoire (Ji et al. 2009). Cela a donné lieu à la production d'inhibiteurs dont certains n'ont pas été autorisés du fait de leur toxicité chez l'homme. Cependant un

inhibiteur de P38, le losmapimod (inhibiteur des isoformes P38 α et P38 β), a été testé sur le plan clinique chez des patients souffrant de douleur neuropathique. Malheureusement les deux essais randomisés contre placebo n'ont pas donné de résultats statistiquement significatifs (Ostenfeld T et al. 2015; Ostenfeld T et al. 2013) peut-être parce que les phénomènes étaient déjà installés depuis de nombreux mois et qu'il pouvait paraître illusoire de pouvoir bloquer les mécanismes douloureux avec une seule molécule. En revanche, les inhibiteurs de P38 sont actifs dans le domaine de la douleur aiguë par excès de nociception. Sur le plan expérimental, l'inhibition de P38 n'a donné lieu à des travaux ni dans les modèles de douleur viscérale aiguë ni dans la douleur viscérale chronique. Il serait donc intéressant de poursuivre nos travaux en évaluant l'efficacité du losmapimod sur notre modèle de douleur viscérale aiguë de façon préventive ou curative mais également sur un modèle de douleur viscérale chronique dans un second temps.

Tout comme la transmission qui met en jeu plusieurs protagonistes, la terminaison de la réponse douloureuse est tout aussi complexe. En effet, après la moelle et le noyau du tractus solitaire, on peut se demander où se termine le message douloureux ? Ce trajet est-il similaire entre les différents types de douleur ? L'imagerie cérébrale nous a aidé à faire des progrès afin de mieux comprendre les zones impliquées dans l'intégration de l'information nociceptive. Il s'agit du thalamus, du cortex somato-sensoriel primaire (partie antérieure rétro rolandique du lobe pariétal), du cortex somato-sensoriel secondaire (lèvre supérieure de la scissure de Sylvius au niveau du cortex pariétal postérieur), de l'insula, et du cortex cingulaire moyen (Tinnermann, Büchel, et Cohen-Adad 2021) (Tracey 2008). D'autres études ont permis d'affiner ces constatations et montrer des différences d'activation chez les personnes atteintes de douleur chronique avec d'autres zones mises en jeu, notamment la région amygdalienne (Mayer et al. 2015). La transmission et l'intégration du message douloureux sont donc des mécanismes complexes. A tous les niveaux, il existe une modulation de ce message avec des éléments dits « facilitateurs » ou « amplificateurs » et d'autres éléments dits « limitateurs » ou « inhibiteurs ». C'est la théorie du « gate control » décrite pour la première fois en 1965 (Melzack et Wall 1965) qui insiste sur le fait qu'à chaque niveau de la transmission de la douleur, l'information douloureuse est l'objet d'une modification d'intensité dans un sens ou dans l'autre. L'intérêt que nous avons porté aux cellules gliales dans la douleur viscérale provient du fait que ces cellules sont les

seules présentes de manière systématique à tous les niveaux du trajet de la douleur. Elles sont présentes dès l'origine et sont appelées cellules gliales entériques. Elles sont présentes au décours dans les ganglions paravertébraux puis au niveau du SNC aussi bien dans la moelle que dans le cerveau. C'est pourquoi leur effet de modulation est fondamental dans le parcours et l'intégration du message douloureux. Elles sont ainsi une cible très intéressante sur le plan pharmacologique dans le contrôle de la douleur viscérale.

Par ailleurs, nous sommes conscients qu'il existe plusieurs limitations à nos travaux. Premièrement, nos travaux ne présentent pas d'évaluation du rôle des cellules gliales entériques dans le transfert du message douloureux viscéral, ni l'étude des cellules gliales au niveau des ganglions paravertébraux. L'analyse de la littérature a permis en effet de mettre en évidence le rôle des cellules gliales viscérales dans la modulation de l'activité neuronale et dans la transmission du message douloureux dans des modèles de douleur viscérale chronique. De plus dans des modèles expérimentaux de douleur chronique de type inflammatoire, il a été mis en évidence que l'inhibition des cellules gliales entériques modifie la transmission du message nerveux et diminue l'activation des cellules gliales du SNC (Lucarini et al. 2021; 2020). Nous avons voulu dans un premier temps confirmer le rôle des cellules gliales de la moelle et du tronc cérébral dans la douleur viscérale aiguë et en particulier le rôle des cellules astrocytaires non décrit précédemment dans la littérature. Deuxièmement, il peut nous être reproché de n'avoir pas utilisé d'autres techniques que les techniques d'immunofluorescence afin de mettre en valeur nos résultats. Il nous a semblé fondamental de visualiser dans un premier temps, aussi bien sur le plan architectural que sur le plan histologique, la présence des cellules gliales dans le tronc et surtout dans le noyau du tractus solitaire, mais aussi dans la moelle épinière après un stimulus douloureux viscéral aigu. Cette étape nous a permis de confirmer les modifications architecturales de ces cellules lors de l'activation dans la douleur viscérale aiguë et de constater que ces modifications étaient observées de manière similaire dans d'autres études expérimentales notamment dans les études sur la douleur neuropathique. De plus la fixation des lames au paraformaldéhyde empêche la réalisation de Western blot ou de RT-PCR sur le même tissu. Comme énoncé précédemment, ce travail sera poursuivi afin de mieux comprendre les mécanismes et les voies de signalisation mises en jeu aussi bien lors de l'activation cellulaire par le stimulus nociceptif que lors de l'utilisation d'agents

thérapeutiques tels que les anesthésiques locaux. Enfin il peut aussi nous être reproché l'utilisation de la minocycline comme inhibiteur microglial par voie systémique. Une étude mettait en doute son efficacité par voie systémique dans un modèle de douleur inflammatoire mais après relecture de la littérature, il n'existe pas à notre connaissance d'autre inhibiteur microglial utilisable à part la minocycline qui est malgré tout utilisée en pratique courante dans les études expérimentales. La minocycline est une molécule lipophile qui traverse facilement la barrière hémato-encéphalique (Zhao et al, 2011). Son action au sein du SNC devrait donc être obtenue facilement même par voie systémique. De plus, la mise en place d'un cathéter intrathécal par voie chirurgicale pour l'instillation de la minocycline aurait entraîné un stimulus douloureux interférant avec l'ensemble de nos résultats.

Dans le tableau suivant, nous avons repris les éléments essentiels de cette thèse ainsi que les travaux futurs que nous envisageons.

Tableau 5 : Etat des connaissances actuelles, apports du travail de thèse et travaux envisagés.

Connaissances actuelles dans la littérature	Apports de notre travail	Perspectives envisagées
Rôle des cellules microgliales et astrocytaires dans la douleur viscérale chronique Rôle des cellules gliales entériques dans la douleur viscérale chronique	Confirmation de l'activation des cellules microgliales et astrocytaires dans le NTS et la moelle dans la douleur viscérale aigue identifiée par la synthèse de TNF-alpha	Etude des cellules gliales entériques dans la douleur viscérale aiguë
Interaction astrocyte microglie dans la douleur neuropathique	Mise en évidence de l'interaction astrocyte microglie dans le NTS pour la douleur viscérale aigue	Etude de l'interaction des cellules gliales dans un modèle de douleur viscérale chronique
Cinétique d'activation des cellules microgliales et astrocytaires étudiées dans les modèles de douleur neuropathique	Mise en évidence de la cinétique parallèle et précoce d'activation des cellules astrocytaires et microgliales dans la douleur viscérale aigue	Etude de la cinétique d'activation dans un modèle de douleur viscérale chronique
Effet des anesthésiques locaux sur les cellules microgliales et astrocytaires dans la moelle dans la douleur neuropathique	Confirmation de la diminution de l'activité des cellules microgliales dans la moelle lors de l'injection de la bupivacaïne dans la douleur viscérale aigue Diminution de l'activité des cellules microgliales dans le NTS dans la douleur viscérale aigue Diminution de la synthèse de TNF-alpha par les cellules microgliales	Etude de l'activité des cellules astrocytaires après injection des anesthésiques locaux aussi bien dans la moelle que dans le NTS Analyse approfondie des voies de signalisation mises en jeu notamment MAPkinases et ERK dans la douleur viscérale aigue
Inefficacité du losmapimod (inhibiteur de P38) dans plusieurs modèles cliniques de douleur neuropathique		Etude de l'action du losmapimod dans des modèles de douleur viscérale aigue et chronique

V) Conclusion :

En conclusion, l'ensemble de ce travail a permis de mieux appréhender les mécanismes d'intégration du message douloureux viscéral aigu dans le SNC et l'importance des cellules gliales dans la médiation du signal douloureux. Nous souhaiterions analyser encore plus précisément cette activation par l'étude du signal intracellulaire dans les cellules gliales. Par ailleurs nous aspirons à mieux comprendre l'effet des anesthésiques locaux sur les cellules gliales dans notre modèle de douleur viscérale aiguë. Enfin, nous souhaitons pouvoir étendre nos résultats à un modèle de douleur viscérale chronique. Le champ de la douleur viscérale reste encore très vaste et les mécanismes mis en jeu restent très peu connus. Seule une meilleure connaissance fondamentale permettra de soulager les patients par la découverte de nouvelles approches thérapeutiques.

VI) Bibliographie

Adachi A. Thermosensitive and osmoreceptive afferent fibers in the hepatic branch of the vagus nerve. *J Auton Nerv Syst.* 1984 May-Jun;10(3-4):269-73. doi: 10.1016/0165-1838(84)90023-7. PMID: 6384336.

Assa A, Ish-Tov A, Rinawi F, Shamir R. School Attendance in Children With Functional Abdominal Pain and Inflammatory Bowel Diseases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015 Nov;61(5):553-7. doi: 10.1097/MPG.0000000000000850. PMID: 25950089.

Basso L, Lapointe TK, Iftinca M, Marsters C, Hollenberg MD, Kurrasch DM, Altier C. Granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF) signaling in spinal microglia drives visceral sensitization following colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Oct 17;114(42):11235-11240. doi: 10.1073/pnas.1706053114. Epub 2017 Oct 2. PMID: 28973941; PMCID: PMC5651747.

Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Von Zastrow M, Beattie MS, Malenka RC. Control of synaptic strength by glial TNF α . *Science.* 2002 Mar 22;295(5563):2282-5. doi: 10.1126/science.1067859. PMID: 11910117.

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 Sep;107(3):461-8. doi: 10.1097/01.anes.0000278903.91986.19. PMID: 17721249.

Beloil 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 Apr;100(4):1081-1086. doi: 10.1213/01.ANE.0000146964.05212.65. PMID: 15781526.

Beloil 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 Jul;105(1):139-45. doi: 10.1097/00000542-200607000-00023. PMID: 16810005.

Berthoud HR, Neuhuber WL. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Auton Neurosci.* 2000 Dec 20;85(1-3):1-17. doi: 10.1016/S1566-0702(00)00215-0. PMID: 11189015.

Blackshaw LA, Grundy D. Responses of vagal efferent fibres to stimulation of gastric mechano- and chemoreceptors in the anaesthetized ferret. *J Auton Nerv Syst*. 1989 Jun;27(1):39-45. doi: 10.1016/0165-1838(89)90127-6. PMID: 2794343.

Blumenthal S, Borgeat A, Pasch T, Reyes L, Booy C, Lambert M, Schimmer RC, Beck-Schimmer B. Ropivacaine decreases inflammation in experimental endotoxin-induced lung injury. *Anesthesiology*. 2006 May ;104(5):961-9. Doi : 10.1097/00000542-200605000-00012. PMID : 16645448.

Bohnert ASB, Ilgen MA. Understanding Links among Opioid Use, Overdose, and Suicide. *N Engl J Med*. 2019 Jan 3;380(1):71-79. doi: 10.1056/NEJMra1802148. PMID: 30601750.

Botschuijver S, van Diest SA, van Thiel IAM, Saia RS, Strik AS, Yu Z, Maria-Ferreira D, Welting O, Keszthelyi D, Jennings G, Heinsbroek SEM, Elferink RPO, Schuren FHJ, de Jonge WJ, van den Wijngaard RM. Miltefosine treatment reduces visceral hypersensitivity in a rat model for irritable bowel syndrome via multiple mechanisms. *Sci Rep*. 2019 Aug 29;9(1):12530. doi: 10.1038/s41598-019-49096-y. PMID: 31467355; PMCID: PMC6715706.

Brookes SJ, Spencer NJ, Costa M, Zagorodnyuk VP. Extrinsic primary afferent signalling in the gut. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013 May;10(5):286-96. doi: 10.1038/nrgastro.2013.29. Epub 2013 Feb 26. PMID: 23438947.

Camilleri M. Novel pharmacology: asimadoline, a kappa-opioid agonist, and visceral sensation. *Neurogastroenterol Motil*. 2008 Sep;20(9):971-9. doi: 10.1111/j.1365-2982.2008.01183.x. PMID: 18715494; PMCID: PMC2698012.

Capoccia E, Cirillo C, Gigli S, Pesce M, D'Alessandro A, Cuomo R, Sarnelli G, Steardo L, Esposito G. Enteric glia: A new player in inflammatory bowel diseases. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2015 Dec;28(4):443-51. doi: 10.1177/0394632015599707. PMID: 26526203.

Chen L, Ilham SJ, Feng B. Pharmacological Approach for Managing Pain in Irritable Bowel Syndrome: A Review Article. *Anesth Pain Med*. 2017 Jan 25;7(2):e42747. doi: 10.5812/aapm.42747. PMID: 28824858; PMCID: PMC5556397.

Chen Z, Xie F, Bao M, Li X, Chao Y, Lin C, Guo R, Zhang C, Wu A, Yue Y, Guan Y, Wang Y. Activation of p38 MAPK in the rostral ventromedial medulla by visceral

noxious inputs transmitted via the dorsal columns may contribute to pelvic organ cross-sensitization in rats with endometriosis. *Neuroscience*. 2015 Apr 16;291:272-8. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.02.021. Epub 2015 Feb 18. PMID: 25701711.

Colburn RW, DeLeo JA, Rickman AJ, Yeager MP, Kwon P, Hickey WF. Dissociation of microglial activation and neuropathic pain behaviors following peripheral nerve injury in the rat. *J Neuroimmunol*. 1997 Nov;79(2):163-75. doi: 10.1016/s0165-5728(97)00119-7. PMID: 9394789.

Colvin LA, Bull F, Hales TG. Perioperative opioid analgesia-when is enough too much? A review of opioid-induced tolerance and hyperalgesia. *Lancet*. 2019 Apr 13;393(10180):1558-1568. doi: 10.1016/S0140-6736(19)30430-1. PMID: 30983591.

Costa DVS, Bon-Frauches AC, Silva AMHP, Lima-Júnior RCP, Martins CS, Leitão RFC, Freitas GB, Castelucci P, Bolick DT, Guerrant RL, Warren CA, Moura-Neto V, Brito GAC. 5-Fluorouracil Induces Enteric Neuron Death and Glial Activation During Intestinal Mucositis via a S100B-RAGE-NF κ B-Dependent Pathway. *Sci Rep*. 2019 Jan 24;9(1):665. doi: 10.1038/s41598-018-36878-z. PMID: 30679569; PMCID: PMC6345953.

Costanza CD, Longstreth GF, Liu AL. Chronic abdominal wall pain: clinical features, health care costs, and long-term outcome. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004 May;2(5):395-9. doi: 10.1016/s1542-3565(04)00124-7. PMID: 15118977.

Curtin CM, Kenney D, Suarez P, Hentz VR, Hernandez-Boussard T, Mackey S, Carroll IR. A Double-Blind Placebo Randomized Controlled Trial of Minocycline to Reduce Pain After Carpal Tunnel and Trigger Finger Release. *J Hand Surg Am*. 2017 Mar;42(3):166-174. doi: 10.1016/j.jhsa.2016.12.011. PMID: 28259273.

De Cassai A, Bonvicini D, Correale C, Sandei L, Tulgar S, Tonetti T. Erector spinae plane block: a systematic qualitative review. *Minerva Anesthesiol*. 2019 Mar;85(3):308-319. doi: 10.23736/S0375-9393.18.13341-4. Epub 2019 Jan 4. PMID: 30621377.

De Leo JA, Tawfik VL, LaCroix-Fralish ML. The tetrapartite synapse: path to CNS sensitization and chronic pain. *Pain*. 2006 May;122(1-2):17-21. doi: 10.1016/j.pain.2006.02.034. Epub 2006 Mar 29. PMID: 16564626.

Delvaux M, Beck A, Jacob J, Bouzamondo H, Weber FT, Frexinos J. Effect of asimadoline, a kappa opioid agonist, on pain induced by colonic distension in patients

with irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004 Jul 15;20(2):237-46. doi: 10.1111/j.1365-2036.2004.01922.x. PMID: 15233705.

Demir IE, Tieftrunk E, Schorn S, Saricaoglu ÖC, Pfitzinger PL, Teller S, Wang K, Waldbaur C, Kurkowski MU, Wörmann SM, Shaw VE, Kehl T, Laschinger M, Costello E, Algül H, Friess H, Ceyhan GO. Activated Schwann cells in pancreatic cancer are linked to analgesia via suppression of spinal astroglia and microglia. *Gut.* 2016 Jun;65(6):1001-14. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309784. Epub 2016 Jan 13. PMID: 26762195.

Drögemüller K, Helmuth U, Brunn A, Sakowicz-Burkiewicz M, Gutmann DH, Mueller W, Deckert M, Schlüter D. Astrocyte gp130 expression is critical for the control of *Toxoplasma* encephalitis. *J Immunol.* 2008 Aug 15;181(4):2683-93. doi: 10.4049/jimmunol.181.4.2683. PMID: 18684959.

El Ouazzani T, Mei N. Mise en evidence electrophysiologique des thermorécepteurs vagues dans la région gastro-intestinale. Leur role dans la régulation de la motricité digestive [Vagal thermoreceptors in the gastro-intestinal area. Their role in the regulation of the digestive motility (author's transl)]. *Exp Brain Res.* 1979 Feb 15;34(3):419-34. French. doi: 10.1007/BF00239140. PMID: 421757.

Fusco P, Cofini V, Petrucci E, Scimia P, Pozzone T, Paladini G, Carta G, Necozone S, Borghi B, Marinangeli F. Transversus Abdominis Plane Block in the Management of Acute Postoperative Pain Syndrome after Caesarean Section: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Pain Physician.* 2016 Nov-Dec;19(8):583-591. PMID: 27906937.

Gao YJ, Zhang L, Samad OA, Suter MR, Yasuhiko K, Xu ZZ, Park JY, Lind AL, Ma Q, Ji RR. JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain. *J Neurosci.* 2009 Apr 1;29(13):4096-108. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3623-08.2009. PMID: 19339605; PMCID: PMC2682921.

Gebhart GF, Bielefeldt K. Physiology of Visceral Pain. *Compr Physiol.* 2016 Sep 15;6(4):1609-1633. doi: 10.1002/cphy.c150049. PMID: 27783853.

Grubišić V, McClain JL, Fried DE, Grants I, Rajasekhar P, Csizmadia E, Ajijola OA, Watson RE, Poole DP, Robson SC, Christofi FL, Gulbransen BD. Enteric Glia Modulate Macrophage Phenotype and Visceral Sensitivity following Inflammation. *Cell Rep.* 2020 Sep 8;32(10):108100. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108100. PMID: 32905782; PMCID: PMC7518300.

Grundmann D, Loris E, Maas-Omlor S, Huang W, Scheller A, Kirchhoff F, Schäfer KH. Enteric Glia: S100, GFAP, and Beyond. *Anat Rec (Hoboken)*. 2019 Aug;302(8):1333-1344. doi: 10.1002/ar.24128. Epub 2019 Apr 29. PMID: 30951262.

Hanani M. Role of satellite glial cells in gastrointestinal pain. *Front Cell Neurosci*. 2015 Oct 13;9:412. doi: 10.3389/fncel.2015.00412. PMID: 26528140; PMCID: PMC4602093.

Holzer P. TRPV1: a new target for treatment of visceral pain in IBS? *Gut*. 2008 Jul;57(7):882-4. doi: 10.1136/gut.2008.149724. PMID: 18559382; PMCID: PMC4370830.

Hu Y, Li W, Lu L, Cai J, Xian X, Zhang M, Li Q, Li L. An anti-nociceptive role for ceftriaxone in chronic neuropathic pain in rats. *Pain*. 2010 Feb;148(2):284-301. doi: 10.1016/j.pain.2009.11.014. Epub 2009 Dec 21. PMID: 20022427.

Huang Y, Zhang D, Li ZY, Yang YT, Wu LJ, Zhang J, Zhi FY, Li XY, Shi Z, Hong J, Ma XP. Moxibustion Eases Chronic Inflammatory Visceral Pain In Rats Via MAPK Signaling Pathway In The Spinal Cord. *J Pain Res*. 2019 Nov 7;12:2999-3012. doi: 10.2147/JPR.S218588. PMID: 31807057; PMCID: PMC6844221.

Inoue K. Purinergic systems in microglia. *Cell Mol Life Sci*. 2008 Oct;65(19):3074-80. doi: 10.1007/s00018-008-8210-3. PMID: 18563292.

Jabaudon M, Belhadj-Tahar N, Rimmelé T, Joannes-Boyau O, Bulyez S, Lefrant JY, Malledant Y, Leone M, Abback PS, Tamion F, Dupont H, Lortat-Jacob B, Guerci P, Kerforne T, Cinotti R, Jacob L, Verdier P, Dugernier T, Pereira B, Constantin JM; Azurea Network. Thoracic Epidural Analgesia and Mortality in Acute Pancreatitis: A Multicenter Propensity Analysis. *Crit Care Med*. 2018 Mar;46(3):e198-e205. doi: 10.1097/CCM.0000000000002874. PMID: 29194144.

Jang E, Kim JH, Lee S, Kim JH, Seo JW, Jin M, Lee MG, Jang IS, Lee WH, Suk K. Phenotypic polarization of activated astrocytes: the critical role of lipocalin-2 in the classical inflammatory activation of astrocytes. *J Immunol*. 2013 Nov 15;191(10):5204-19. doi: 10.4049/jimmunol.1301637. Epub 2013 Oct 2. PMID: 24089194.

Jha MK, Jo M, Kim JH, Suk K. Microglia-Astrocyte Crosstalk: An Intimate Molecular Conversation. *Neuroscientist*. 2019 Jun;25(3):227-240. doi: 10.1177/1073858418783959. Epub 2018 Jun 22. PMID: 29931997.

Ji RR, Berta T, Nedergaard M. Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain*. 2013 Dec;154 Suppl 1(0 1):S10-S28. doi: 10.1016/j.pain.2013.06.022. Epub 2013 Jun 20. PMID: 23792284; PMCID: PMC3858488.

Jin SX, Zhuang ZY, Woolf CJ, Ji RR. p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. *J Neurosci*. 2003 May 15;23(10):4017-22. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-10-04017.2003. PMID: 12764087; PMCID: PMC6741086.

Kahokehr A, Sammour T, Srinivasa S, Hill AG. Systematic review and meta-analysis of intraperitoneal local anaesthetic for pain reduction after laparoscopic gastric procedures. *Br J Surg*. 2011 Jan;98(1):29-36. doi: 10.1002/bjs.7293. PMID: 20979101.

Kannampalli P, Pochiraju S, Bruckert M, Shaker R, Banerjee B, Sengupta JN. Analgesic effect of minocycline in rat model of inflammation-induced visceral pain. *Eur J Pharmacol*. 2014 Mar 15;727:87-98. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.01.026. Epub 2014 Jan 28. PMID: 24485889; PMCID: PMC3984928.

Kaushal-Deep SM, Lodhi M, Anees A, Khan S, Khan MA. Evolution of Various Components of Pain After Laparoscopic Cholecystectomy: Importance of Its Prognostication for Effective Pain Control Using a Local Anesthetic and for Making a Valid Practical "Discharge Criteria" Model Predicting Early Discharge of Patients. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*. 2018 Apr;28(4):389-401. doi: 10.1089/lap.2017.0530. Epub 2017 Dec 7. PMID: 29215954.

Kfoury T, Mazoit JX, Schumacher M, Benhamou D, Beloeil H. A comparison of different dosages of a continuous preperitoneal infusion and systemic administration of ropivacaine after laparotomy in rats. *Anesth Analg*. 2011 Sep;113(3):617-25. doi: 10.1213/ANE.0b013e31821f108a. Epub 2011 May 19. PMID: 21596868.

Kleine-Borgmann J, Schmidt K, Scharmach K, Zunhammer M, Elsenbruch S, Bingel U, Forkmann K. Does pain modality play a role in the interruptive function of acute visceral compared with somatic pain? *Pain*. 2022 Apr 1;163(4):735-744. Doi : 10.1097/j.pain.0000000000002418. PMID : 34338242 ; PMCID : PMC8929302.

Kobayashi K, Yamanaka H, Fukuoka T, Dai Y, Obata K, Noguchi K. P2Y12 receptor upregulation in activated microglia is a gateway of p38 signaling and neuropathic pain.

J Neurosci. 2008 Mar 12;28(11):2892-902. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5589-07.2008. PMID: 18337420; PMCID: PMC6670682.

Kondo T, Sakurai J, Miwa H, Noguchi K. Activation of p38 MAPK through transient receptor potential A1 in a rat model of gastric distension-induced visceral pain. *Neuroreport*. 2013 Jan 23;24(2):68-72. doi: 10.1097/WNR.0b013e32835c7df2. PMID: 23222658.

Lavand'homme PM, Roelants F. Evaluation of pregabalin as an adjuvant to patient-controlled epidural analgesia during late termination of pregnancy. *Anesthesiology*. 2010 Nov ;113(5) :1186-91. Doi : 10.1097/ALN.0b013e3181f5d32d. PMID : 20938333.

Lin Y, Tian G, Roman K, Handy C, Travers JB, Lin CL, Stephens RL Jr. Increased glial glutamate transporter EAAT2 expression reduces visceral nociceptive response in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009 Jan;296(1):G129-34. doi: 10.1152/ajpgi.90556.2008. Epub 2008 Nov 20. PMID: 19023027; PMCID: PMC2636927.

Liu PY, Lee IH, Tan PH, Wang YP, Tsai CF, Lin HC, Lee FY, Lu CL. P2X7 Receptor Mediates Spinal Microglia Activation of Visceral Hyperalgesia in a Rat Model of Chronic Pancreatitis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2015 Jul 22;1(6):710-720.e5. doi: 10.1016/j.jcmgh.2015.07.008. PMID: 28210704; PMCID: PMC5301503.

Liu PY, Lu CL, Wang CC, Lee IH, Hsieh JC, Chen CC, Lee HF, Lin HC, Chang FY, Lee SD. Spinal microglia initiate and maintain hyperalgesia in a rat model of chronic pancreatitis. *Gastroenterology*. 2012 Jan;142(1):165-173.e2. doi: 10.1053/j.gastro.2011.09.041. Epub 2011 Oct 1. PMID: 21963786.

Liu Y, Zhou LJ, Wang J, Li D, Ren WJ, Peng J, Wei X, Xu T, Xin WJ, Pang RP, Li YY, Qin ZH, Murugan M, Mattson MP, Wu LJ, Liu XG. TNF- α Differentially Regulates Synaptic Plasticity in the Hippocampus and Spinal Cord by Microglia-Dependent Mechanisms after Peripheral Nerve Injury. *J Neurosci*. 2017 Jan 25;37(4):871-881. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2235-16.2016. PMID: 28123022; PMCID: PMC5296781.

Lu Y, Zhao LX, Cao DL, Gao YJ. Spinal injection of docosahexaenoic acid attenuates carrageenan-induced inflammatory pain through inhibition of microglia-mediated neuroinflammation in the spinal cord. *Neuroscience*. 2013 Jun 25 ;241 :22-31. Doi : 10.1016/j.neuroscience.2013.03.003. Epub 2013 Mar 14. PMID : 23500096.

Lucarini E, Parisio C, Branca JJV, Segnani C, Ippolito C, Pellegrini C, Antonioli L, Fornai M, Micheli L, Pacini A, Bernardini N, Blandizzi C, Ghelardini C, Di Cesare Mannelli L. Deepening the Mechanisms of Visceral Pain Persistence: An Evaluation of the Gut-Spinal Cord Relationship. *Cells*. 2020 Jul 24;9(8):1772. doi: 10.3390/cells9081772. PMID: 32722246; PMCID: PMC7464824.

Lucarini E, Seguella L, Vincenzi M, Parisio C, Micheli L, Toti A, Corpetti C, Del Re A, Squillace S, Maftei D, Lattanzi R, Ghelardini C, Di Cesare Mannelli L, Esposito G. Role of Enteric Glia as Bridging Element between Gut Inflammation and Visceral Pain Consolidation during Acute Colitis in Rats. *Biomedicines*. 2021 Nov 12;9(11):1671. doi: 10.3390/biomedicines9111671. PMID: 34829900; PMCID: PMC8616000.

Ma N, Duncan JK, Scarfe AJ, Schuhmann S, Cameron AL. Clinical safety and effectiveness of transversus abdominis plane (TAP) block in post-operative analgesia: a systematic review and meta-analysis. *J Anesth*. 2017 Jun;31(3):432-452. doi: 10.1007/s00540-017-2323-5. Epub 2017 Mar 7. PMID: 28271227.

Mayer EA, Gupta A, Kilpatrick LA, Hong JY. Imaging brain mechanisms in chronic visceral pain. *Pain*. 2015 Apr;156 Suppl 1(0 1):S50-S63. doi: 10.1097/j.pain.000000000000106. PMID: 25789437; PMCID: PMC4428597.

Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. *Science*. 1965 Nov 19;150(3699):971-9. doi: 10.1126/science.150.3699.971. PMID: 5320816.

Morales-Soto W, Gulbransen BD. Enteric Glia: A New Player in Abdominal Pain. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2019;7(2):433-445. doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.11.005. Epub 2018 Nov 24. PMID: 30739868; PMCID: PMC6369218.

Nagele RG, Wegiel J, Venkataraman V, Imaki H, Wang KC, Wegiel J. Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2004 May-Jun;25(5):663-74. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2004.01.007. PMID: 15172746.

Nie H, Zhang H, Weng HR. Minocycline prevents impaired glial glutamate uptake in the spinal sensory synapses of neuropathic rats. *Neuroscience*. 2010 Oct 27;170(3):901-12. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.07.049. Epub 2010 Aug 3. PMID: 20678556; PMCID: PMC2939184.

Obata H, Eisenach JC, Hussain H, Bynum T, Vincler M. Spinal glial activation contributes to postoperative mechanical hypersensitivity in the rat. *J Pain*. 2006 Nov;7(11):816-22. doi: 10.1016/j.jpain.2006.04.004. PMID: 17074623.

Oberheim NA, Tian GF, Han X, Peng W, Takano T, Ransom B, Nedergaard M. Loss of astrocytic domain organization in the epileptic brain. *J Neurosci*. 2008 Mar 26;28(13):3264-76. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4980-07.2008. PMID: 18367594; PMCID: PMC6670598.

Odell ID, Cook D. Immunofluorescence techniques. *J Invest Dermatol*. 2013 Jan;133(1):e4. doi: 10.1038/jid.2012.455. PMID: 23299451.

Olesen SS, Graversen C, Olesen AE, Frøkjær JB, Wilder-Smith O, van Goor H, Valeriani M, Drewes AM. Randomised clinical trial: pregabalin attenuates experimental visceral pain through sub-cortical mechanisms in patients with painful chronic pancreatitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011 Oct;34(8):878-87. doi: 10.1111/j.1365-2036.2011.04802.x. Epub 2011 Aug 16. PMID: 21848870.

Ostenfeld T, Krishen A, Lai RY, Bullman J, Baines AJ, Green J, Anand P, Kelly M. Analgesic efficacy and safety of the novel p38 MAP kinase inhibitor, losmapimod, in patients with neuropathic pain following peripheral nerve injury: a double-blind, placebo-controlled study. *Eur J Pain*. 2013 Jul;17(6):844-57. doi: 10.1002/j.1532-2149.2012.00256.x. Epub 2012 Dec 14. PMID: 23239139.

Ostenfeld T, Krishen A, Lai RY, Bullman J, Green J, Anand P, Scholz J, Kelly M. A randomized, placebo-controlled trial of the analgesic efficacy and safety of the p38 MAP kinase inhibitor, losmapimod, in patients with neuropathic pain from lumbosacral radiculopathy. *Clin J Pain*. 2015 Apr;31(4):283-93. doi: 10.1097/AJP.000000000000122. PMID: 25751578.

Patrizi F, Freedman SD, Pascual-Leone A, Fregni F. Novel therapeutic approaches to the treatment of chronic abdominal visceral pain. *ScientificWorldJournal*. 2006 Apr 18;6:472-90. doi: 10.1100/tsw.2006.98. PMID: 16633700; PMCID: PMC5917265.

Piao ZG, Cho IH, Park CK, Hong JP, Choi SY, Lee SJ, Lee S, Park K, Kim JS, Oh SB. Activation of glia and microglial p38 MAPK in medullary dorsal horn contributes to tactile hypersensitivity following trigeminal sensory nerve injury. *Pain*. 2006 Apr;121(3):219-231. doi: 10.1016/j.pain.2005.12.023. Epub 2006 Feb 21. PMID: 16495005.

Protic M, Veljkovic R, Bilchik AJ, Popovic A, Kresoja M, Nissan A, Avital I, Stojadinovic A. Prospective randomized controlled trial comparing standard analgesia with combined intra-operative cystic plate and port-site local anesthesia for post-operative pain management in elective laparoscopic cholecystectomy. *Surg Endosc.* 2017 Feb;31(2):704-713. doi: 10.1007/s00464-016-5024-5. Epub 2016 Jun 20. PMID: 27324337.

Qiao LY, Tiwari N. Spinal neuron-glia-immune interaction in cross-organ sensitization. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2020 Dec 1;319(6):G748-G760. doi: 10.1152/ajpgi.00323.2020. Epub 2020 Oct 21. PMID: 33084399; PMCID: PMC7792669.

Raghavendra V, Tanga F, DeLeo JA. Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Aug;306(2):624-30. doi: 10.1124/jpet.103.052407. Epub 2003 May 6. PMID: 12734393.

Ramos KM, Lewis MT, Morgan KN, Crysedale NY, Kroll JL, Taylor FR, Harrison JA, Sloane EM, Maier SF, Watkins LR. Spinal upregulation of glutamate transporter GLT-1 by ceftriaxone: therapeutic efficacy in a range of experimental nervous system disorders. *Neuroscience.* 2010 Sep 15;169(4):1888-900. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.06.014. Epub 2010 Jun 11. PMID: 20547213; PMCID: PMC2918694.

Ren K, Dubner R. Neuron-glia crosstalk gets serious: role in pain hypersensitivity. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2008 Oct;21(5):570-9. doi: 10.1097/ACO.0b013e32830eddbf. PMID: 18784481; PMCID: PMC2735048.

Robinson CR, Zhang H, Dougherty PM. Astrocytes, but not microglia, are activated in oxaliplatin and bortezomib-induced peripheral neuropathy in the rat. *Neuroscience.* 2014 Aug 22;274:308-17. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.05.051. Epub 2014 Jun 4. PMID: 24905437; PMCID: PMC4099296. Romero-Sandoval A, Chai N, Nutile-McMenemy N, Deleo JA. A comparison of spinal Iba1 and GFAP expression in rodent models of acute and chronic pain. *Brain Res.* 2008 Jul 11;1219:116-26. doi: 10.1016/j.brainres.2008.05.004. Epub 2008 May 11. PMID: 18538310; PMCID: PMC2512259.

Saab CY, Wang J, Gu C, Garner KN, Al-Chaer ED. Microglia: a newly discovered role in visceral hypersensitivity? *Neuron Glia Biol.* 2006 Nov;2(4):271-7. doi: 10.1017/S1740925X07000439. PMID: 18496611; PMCID: PMC2391075.

Saito YA, Almazar AE, Tilkes KE, Choung RS, Van Norstrand MD, Schleck CD, Zinsmeister AR, Talley NJ. Randomised clinical trial: pregabalin vs placebo for irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther.* 2019 Feb;49(4):389-397. Doi: 10.1111/apt.15077. Epub 2019 Jan 20. PMID: 30663077; PMCID: PMC6349499.

Salter MW, Stevens B. Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med.* 2017 Sep 8;23(9):1018-1027. doi: 10.1038/nm.4397. PMID: 28886007.

Shian B, Larson ST. Abdominal Wall Pain: Clinical Evaluation, Differential Diagnosis, and Treatment. *Am Fam Physician.* 2018 Oct 1;98(7):429-436. PMID: 30252418.

Shinozaki Y, Shibata K, Yoshida K, Shigetomi E, Gachet C, Ikenaka K, Tanaka KF, Koizumi S. Transformation of Astrocytes to a Neuroprotective Phenotype by Microglia via P2Y₁ Receptor Downregulation. *Cell Rep.* 2017 May 9;19(6):1151-1164. doi: 10.1016/j.celrep.2017.04.047. PMID: 28494865.

Sun YN, Luo JY, Rao ZR, Lan L, Duan L. GFAP and Fos immunoreactivity in lumbosacral spinal cord and medulla oblongata after chronic colonic inflammation in rats. *World J Gastroenterol.* 2005 Aug 21;11(31):4827-32. doi: 10.3748/wjg.v11.i31.4827. PMID: 16097052; PMCID: PMC4398730.

Svensson CI, Marsala M, Westerlund A, Calcutt NA, Campana WM, Freshwater JD, Catalano R, Feng Y, Protter AA, Scott B, Yaksh TL. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia is a critical link in inflammation-induced spinal pain processing. *J Neurochem.* 2003 Sep;86(6):1534-44. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01969.x. PMID: 12950462.

Tinnermann A, Büchel C, Cohen-Adad J. Cortico-spinal imaging to study pain. *Neuroimage.* 2021 Jan 1;224:117439. doi: 10.1016/j.neuroimage.2020.117439. Epub 2020 Oct 8. PMID: 33039624.

Toda S, Sakai A, Ikeda Y, Sakamoto A, Suzuki H. 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. 2011 Jan 7;7:2. doi: 10.1186/1744-8069-7-2. PMID: 21211063; PMCID: PMC3022746.

Traub RJ, Sengupta JN, Gebhart GF. Differential c-fos expression in the nucleus of the solitary tract and spinal cord following noxious gastric distention in the rat. *Neuroscience*. 1996 Oct ;74(3) :873-84. Doi : 10.1016/0306-4522(96)00173-x. PMID : 8884783.

Tsuda M, Mizokoshi A, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Inoue K. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. *Glia*. 2004 Jan 1;45(1):89-95. doi: 10.1002/glia.10308. PMID: 14648549.

Vanelderen P, Van Zundert J, Kozicz T, Puylaert M, De Vooght P, Mestrum R, Heylen R, Roubos E, Vissers K. Effect of minocycline on lumbar radicular neuropathic pain: a randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial with amitriptyline as a comparator. *Anesthesiology*. 2015 Feb;122(2):399-406. doi: 10.1097/ALN.0000000000000508. PMID: 25373391.

Vermeulen W, De Man JG, Pelckmans PA, De Winter BY. Neuroanatomy of lower gastrointestinal pain disorders. *World J Gastroenterol*. 2014 Jan 28;20(4):1005-20. doi: 10.3748/wjg.v20.i4.1005. PMID: 24574773; PMCID: PMC3921524.

Verne GN, Robinson ME, Vase L, Price DD. Reversal of visceral and cutaneous hyperalgesia by local rectal anesthesia in irritable bowel syndrome (IBS) patients. *Pain*. 2003 Sep;105(1-2):223-30. doi: 10.1016/s0304-3959(03)00210-0. PMID: 14499439.

Wang XW, Li TT, Zhao J, Mao-Ying QL, Zhang H, Hu S, Li Q, Mi WL, Wu GC, Zhang YQ, Wang YQ. Extracellular signal-regulated kinase activation in spinal astrocytes and microglia contributes to cancer-induced bone pain in rats. *Neuroscience*. 2012 Aug 16;217:172-81. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.04.065. Epub 2012 May 5. PMID: 22564552.

Werdehausen R, Kremer D, Brandenburger T, Schlösser L, Jadasz J, Küry P, Bauer I, Aragón C, Eulenburg V, Hermanns H. Lidocaine metabolites inhibit glycine transporter 1: a novel mechanism for the analgesic action of systemic lidocaine? *Anesthesiology*. 2012 Jan;116(1):147-58. doi: 10.1097/ALN.0b013e31823cf233. Erratum in: *Anesthesiology*. 2012 Jun;116(6):1404. PMID: 22133759.

Woolf CJ. What is this thing called pain? *J Clin Invest*. 2010 Nov;120(11):3742-4. doi: 10.1172/JCI45178. Epub 2010 Nov 1. PMID: 21041955; PMCID: PMC2965006.

Yuan J, Fei Y. Lidocaine activates autophagy of astrocytes and ameliorates chronic constriction injury-induced neuropathic pain. *J Biochem*. 2021 Sep 22;170(1):25-31. doi: 10.1093/jb/mvaa136. PMID: 33245112.

Yuan T, Li Z, Li X, Yu G, Wang N, Yang X. Lidocaine attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in microglia. *J Surg Res*. 2014 Nov;192(1):150-62. doi: 10.1016/j.jss.2014.05.023. Epub 2014 May 15. PMID: 24952412.

Zhang J, Deng X. Bupivacaine effectively relieves inflammation-induced pain by suppressing activation of the NF- κ B signalling pathway and inhibiting the activation of spinal microglia and astrocytes. *Exp Ther Med*. 2017 Mar;13(3):1074-1080. doi: 10.3892/etm.2017.4058. Epub 2017 Jan 18. PMID: 28450945; PMCID: PMC5403393.

Zhao F, Hua Y, He Y, Keep RF, Xi G. Minocycline-induced attenuation of iron overload and brain injury after experimental intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2011 Dec;42(12):3587-93. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.623926. Epub 2011 Oct 13. PMID: 21998050; PMCID: PMC3226873.

Zhuang ZY, Gerner P, Woolf CJ, Ji RR. ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. *Pain*. 2005 Mar;114(1-2):149-59. doi: 10.1016/j.pain.2004.12.022. Epub 2005 Jan 26. PMID: 15733640.

Intégration du message douloureux viscéral aigu au niveau du Système Nerveux Central : Interaction Astrocytes-Microglie.

Mots clés : douleur viscérale, astrocytes, microglie, système nerveux central, anesthésiques locaux.

Résumé : La douleur viscérale est un problème de santé publique. Les traitements disponibles sont souvent inefficaces. L'intégration du message douloureux au niveau du système nerveux central (SNC) met en jeu deux types cellulaires qui constituent la glie : la microglie et les astrocytes. Le but de notre travail est d'évaluer le rôle de ces cellules dans la douleur viscérale aiguë, leur cinétique d'activation et leurs interactions. Dans un modèle de douleur viscérale aiguë par injection intrapéritonéale de carragénine chez le rat, nous avons pu démontrer une activation concomitante de la microglie et des astrocytes dans le SNC, maximale à la 24^{ème} heure et diminuant dès la 48^{ème} heure.

L'inhibition microgliale par la minocycline entraîne une inhibition astrocytaire dans le tronc dans ce même modèle de douleur. L'inhibition astrocytaire par la ceftriaxone ne modifie pas l'activité microgliale. L'effet inhibiteur d'un anesthésique local (bupivacaïne) dans la douleur viscérale est médié par la diminution de la densité et de l'activation de la microglie dans la moelle et le tronc. Les cellules gliales jouent donc un rôle prépondérant dans la transmission et l'intégration du message douloureux viscéral aigu par leur activation rapide et conjointe. Elles peuvent être une cible thérapeutique dans le traitement de la douleur viscérale.

Title : Integration of the acute visceral pain message in the Central Nervous System: Astrocyte-microglia interaction

Keywords : acute visceral pain, microglia, astrocytes, local anaesthetics.

Abstract : Visceral pain is a public health problem. Available treatments are often ineffective. Integration of the pain message in the central nervous system (CNS) involves two cell types that constitute the glia: microglia and astrocytes. The aim of this work was to evaluate the role of these cells in acute visceral pain, their activation kinetics and their interactions. In a rat model of acute visceral pain by intraperitoneal injection of carrageenan, we demonstrated a concomitant activation of microglia and astrocytes in the CNS, which was maximal at 24 hours and decreased from the 48th hour. Microglial inhibition by minocycline leads to astrocytic inhibition in the

brainstem in the same pain model. Astrocytic inhibition by ceftriaxone does not alter microglial activity. The inhibitory effect of a local anaesthetic (bupivacaine) in visceral pain is mediated by a decreased density and activation of microglia in the spinal cord and the brainstem. Glial cells thus play a prominent role in the transmission and integration of the acute visceral pain message through their rapid and joint activation. They may be a therapeutic target in the treatment of visceral pain.