Université de Sherbrooke

# Implication des récepteurs à la neurotensine dans l'amélioration de paramètres de qualité de vie dans un modèle murin de douleur neuropathique chronique

Par
Pascal Tétreault, M.Sc
Programme de physiologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du grade de *philosophiae doctor* (Ph.D.) en physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada

Juillet 2013

Membre du jury d'évaluation

Pr. Louis Gendron, Ph.D. Physiologie et Biophysique (Président de jury)

Pr. Philippe Sarret, Ph. D. Physiologie et Biophysique (Directeur de recherche)

Pr. Yannick Tousignant-Laflamme, Pht, Ph.D. Physiothérapie (Évaluateur externe au programme)

Pr. Pierre Beaulieu, M. D., Ph. D., F.R.C.A. Pharmacologie, Université de Montréal (Évaluateur externe à l'Université)

© Pascal Tétreault, 2013

À tous ceux qui m'ont encouragé à continuer,
qui m'ont aidé à prendre les bonnes décisions,
à différents moments de ma vie
et de mon cheminement académique.

*Le cerveau, comme le parachute, doit être ouvert pour fonctionner*
- Pierre Daninos -

*La difficulté n'est pas de comprendre les idées nouvelles,*
*mais d'échapper aux idées anciennes*
- John Maynard Keynes -

# Résumé


**Implication des récepteurs à la neurotensine dans l'amélioration de paramètres de qualité de vie dans un modèle murin de douleur neuropathique chronique**

Par Pascal Tétreault, M.Sc
Programme de physiologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de philosophiae doctor (Ph.D.) en physiologie

Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Malgré les avancées majeures réalisées dans le monde de la médecine depuis plusieurs années, la gestion de la douleur est encore aujourd'hui un problème médical des plus important. Les patients se voient offrir un nombre limité de composés analgésiques, qui se présentent souvent avec des effets secondaires importants ou tout simplement un manque flagrant d'efficacité pour leur condition douloureuse spécifique. Face à ce constat, le milieu de la recherche en douleur est en profonde réflexion depuis quelques années par rapport à la difficulté d'introduire en clinique de nouveaux composés analgésiques fonctionnels. Parmi les hypothèses soulevées pour tenter de répondre à cette grande problématique, il a été proposé d'améliorer les méthodes d'évaluations précliniques de la douleur, de développer de nouveaux modèles de douleur plus proches de la réalité clinique, de cibler de nouvelles voies moléculaires impliquées dans la douleur, de trouver des alternatives aux approches pharmacologiques classiques, etc. Ces différentes pistes de réponse sont à l'heure actuelle en cours d'études dans de nombreux laboratoires dans le monde. Dans le cadre de mes projets de doctorat, je me suis intéressé à cette problématique de différentes façons. Nous avons tout d'abord validé un nouvel appareil comportemental qui permet d'évaluer des composantes de la douleur chronique qui sont rarement évaluées avec les tests actuellement disponibles. À l'aide de trois modèles de douleur chronique bien établis dans la littérature, soit un modèle de douleur inflammatoire (CFA pour *Complete Freund Adjuvant*), de douleur neuropathique (CCI pour *Chronic Constriction Injury*) et de douleur cancéreuse osseuse (tumeur fémorale), nous avons montré que le test de distribution pondérale dynamique (ou DWB pour *Dynamic Weight Bearing*) permet tout d'abord de détecter l'évolution des douleurs de façon comparable au test classique de von Frey pour l'allodynie mécanique. De plus, au moins trois autres paramètres pertinents associés à des composantes de qualité de vie ont pu être tirés de nos analyses. En effet, le poids posé sur chacune des pattes, leur temps d'utilisation durant le test et leur surface de contact avec le sol représentent des facettes de l'inconfort s'apparentant à ce qui peut être observé en clinique, mais qui ont rarement été étudié dans un contexte préclinique. Après la démonstration de l'aspect novateur de cet appareil, nous avons voulu valider son efficacité à détecter un effet analgésique, tout en s'interrogeant sur la pertinence clinique de nouvelles cibles

thérapeutiques. En effet, notre laboratoire s'intéresse au système neurotensinergique, constitué principalement de la neurotensine (NT) et de deux récepteurs couplés aux protéines G (NTS1 et NTS2), et de son fort potentiel analgésique dans différentes conditions douloureuses. Résultant de plusieurs collaborations avec des équipes de chimie médicinale, le laboratoire est maintenant pourvu d'un grand nombre d'agonistes liant les récepteurs à la NT. Nous avons ainsi évalué l'efficacité d'agonistes sélectifs du récepteur NTS2, soit le JMV431, la lévocabastine et la β-lactotensine, en plus d'un agoniste non sélectif de dernières générations, le JMV2009, présentant des caractéristiques pharmacologiques particulières. Après injection intrathécale, la plupart de ces agonistes se sont montrés d'une grande efficacité pour réduire l'allodynie mécanique présente chez les animaux atteints de douleur neuropathique, en plus d'améliorer de façon remarquable les différents paramètres de qualité de vie préalablement identifiés par notre étude portant sur la caractérisation du DWB. Il était également important de tester des molécules qui sont actuellement prescrites en clinique. Nous avons ainsi spécifiquement choisi des médicaments de première et de deuxième ligne pour le traitement de la douleur neuropathique, soit l'amytriptyline, la prégabaline et la morphine. Tous ces traitements ont été en mesure de réduire la présence d'allodynie mécanique chez les animaux CCI. Toutefois, la majorité de ces composés se sont avérés incapables de renverser les composantes de qualité de vie durant le test de DWB, et ce en utilisant les mêmes doses qui s'étaient montrées efficaces pour réduire l'allodynie mécanique. Cette dernière observation pourrait, au moins en partie, expliquer pourquoi les patients rapportent souvent une mauvaise gestion de leur douleur lorsqu'ils reçoivent ces traitements. Dernièrement, dans l'optique de mieux comprendre le fonctionnement du système neurotensinergique et de chercher des alternatives aux approches pharmacologiques, nous avons utilisé une technique d'interférence de l'ARN pour évaluer le rôle du récepteur NTS2 dans un contexte de douleur tonique. Nous avons alors montré que l'invalidation génique de ce récepteur était en mesure d'inhiber complètement l'effet analgésique induit normalement suivant une injection intrathécale de l'agoniste JMV431. Cette preuve de concept nous indique l'importance de ce récepteur dans la modulation de la douleur et montre également que l'interférence de l'ARN représente une technologie applicable au niveau du système nerveux central. Finalement, à la lumière de nos résultats, il est possible d'affirmer que le système neurotensinergique représente de nouvelles cibles thérapeutiques très prometteuses pour diminuer les signes de douleur neuropathique de type réflexif en plus d'améliorer différents paramètres de qualité de vie. Il est alors possible d'espérer que des agonistes neurotensinergique feront prochainement leur chemin ver la clinique afin d'améliorer le bien-être des patients.

Mots clé : Douleur chronique, douleur neuropathique, récepteurs à la neurotensine, agonistes, paramètres de qualité de vie, inconfort.

# Summary


**Neurotensin receptor implication in quality of life and pain relief in a murine animal model of chronic neuropathic pain**

By Pascal Tétreault, M.Sc
Physiology program

Thesis presented at the Faculty of medicine and health sciences for the obtention of Doctor degree diploma philosophiae doctor (Ph.D.) in physiology

Faculty of medicine and health sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Despite recent years major progress in medicine, pain management remains an important medical problem. Patients has to deal with a limited number of analgesic compounds, that frequently shows severe side effects or a complete lack of efficacy for their specific painful condition. In light of this problem, pain scientists has gone through a profound thinking state regarding the difficulty to introduce new and potent analgesic molecules to patient's bedside. Numerous hypothesis has been proposed to address this great challenge, among them, it has been proposed to improve preclinical pain assessment techniques, develop new pain model closer to clinical reality, screen new molecular pathways implicated in pain processing, find alternatives to classical pharmacological approaches, etc. Most of these various possible answers are currently being studied in laboratories around the world. As part of my Ph.D projects, I addressed these problems in different ways. We first validated a novel behavioural device that allows the appraisal of chronic pain components that are seldom evaluated with currently available tests. By using three well documented chronic pain models, namely chronic constriction injury (CCI, neuropathic pain), complete's Freund Adjuvant (CFA, inflammatory model), and femoral tumor (bone cancer pain), we showed that the dynamic weight bearing (DWB) test is first able to efficiently detect pain development in a similar way as for the classical von Frey test for mechanical allodynia. In addition, our analysis revealed that at least three other interesting parameters associated to quality of life proxies can be obtained with the DWB. In fact, the weight bore on each paw, the time spent on them and the flooring contact surface is considered to be discomfort aspects akin to what can be observed clinically, that has however rarely been studied in a preclinical paradigm. After demonstrating the novelty of this device, we wanted to validate its effectiveness to detect analgesic effects, and at the same time evaluate the clinical relevance of new therapeutic targets. Indeed, the neurotensinergic system, mainly comprising the neurotensine (NT) and two G protein coupled receptor (NTS1 and NTS2) is one of the main research interests of our laboratory, regarding the analgesic role of this system in various painful conditions. Several collaborations established with our lab and various medicinal chemistry teams have led to the development of numerous agonists holding the capacity to bind NT receptors. We thus established the efficacy of different NTS2 selective agonist, namely JMV431, levocabastine and β-lactotensine, and one new

non-selective agonist, the JMV2009, that showed interesting pharmacological properties. Following intrathecal injection, most of these compounds were able to attenuate mechanical allodynia present in neuropathic pain animals and also remarkably improved the various quality of life proxies that we previously identified in our first study on the DWB characterization. Validation with currently prescribed drugs is an important aspect of new drug screening. We thus carefully choose amytriptyline, pregabaline and morphine, drugs that are identified as first and second line treatments options for neuropathic pain. Accordingly, all of these compounds significantly reduce mechanical allodynia observed in CCI rats. Most of these drugs were however unable to ameliorates quality of life proxies during DWB evaluation, with doses that have been demonstrated to be efficient to reduce mechanical allodynia. This latest discovery could, at least in part, explain the poor pain management reported from patients receiving those treatments. We further studied the specific role of NTS2 receptor in tonic pain by using an RNA interference technology, giving us new insights on neurotensinergic system mechanisms. This new approach also represents a promising alternative to classic pharmacological techniques. We thus show that down regulation of NTS2 receptor by RNA interference was able to completely inhibit analgesia normally induced following JMV431 inrathecal injection. This proof of concept study indicate that NTS2 receptor is a key player in pain modulation and further established RNA interference as a potent technology that can be applied to the central nervous system. Finally, in light of our results, it seems possible to say that the neurotensinergic system comprise promising new therapeutic targets that holds the possibility to reduce reflexive signs of neuropathic pain in addition to improving quality of life proxies as assessed with an innovative device. We can now just hope to see neurotensinergic agonists make their way to the clinic to ultimately improve patient's well-being.

Keywords : Chronic pain, neuropathic pain, neurotensin receptors, agonists, quality of life proxies.

# Table des matières

**Résumé** ..... v

**Summary** ..... vii

**Table des matières** ..... ix

**Liste des figures** ..... xi

**Liste des tableaux** ..... xiii

**Liste des abréviations** ..... xiv

**Introduction** ..... 1
- **Avant propos** ..... 1
- **La douleur dans l'histoire** ..... 2
- **La douleur utile** ..... 4
- **La douleur dans toute sa complexité** ..... 5
  - La douleur aiguë ..... 6
  - La douleur tonique ou persistante ..... 9
  - La douleur chronique ..... 10
- **Neurophysiologie de la douleur neuropathique** ..... 15
  - La sensibilisation périphérique ..... 15
  - L'activité ectopique des fibres nerveuses ..... 17
  - La sensibilisation centrale ..... 19
  - Modification des régions corticales impliquées dans la douleur ..... 22
  - Modulation descendante ..... 24
  - Implications immunitaire et gliale en périphérie ..... 24
  - Implications immunitaire et gliale au niveau central ..... 27
- **Traitement actuel de la douleur neuropathique** ..... 28
  - Traitements pharmacologiques ..... 28
  - Traitements non pharmacologiques ..... 32
- **Modèles animaux de douleurs neuropathiques** ..... 35
  - Modèles périphériques de douleur neuropathique ..... 37
- **Problématique de recherche** ..... 40
- **Le système neurotensinergique** ..... 47
  - La neurotensine ..... 48
  - Les récepteurs à la neurotensine ..... 52
  - Caractérisation de nouvelles molécules neurotensinergiques ..... 58

**Hypothèse et objectifs de recherche** ..... 66

**Article 1** ..... 67
- **Weight bearing evaluation in inflammatory, neuropathic and cancer chronic pain in freely moving rats** ..... 67

**Article 2** ..... 99
- **Spinal NTS2 Receptor Activation Reverses Signs of Neuropathic Pain** ..... 99

**Discussion** ..... 148
- **La gestion de la douleur : une lutte encore d'actualité?** ..... 148
- **Le défi de l'évaluation préclinique de la douleur** ..... 149
- **Agrandir la pharmacopée pour la gestion de la douleur neuropathique** ..... 152

**Développer et caractériser des agonistes neurotensinergique de seconde génération** ..... 157
**Une approche non pharmacologique pour s'attaquer à la douleur** ..... 164
**Perspectives** ..... 170
**Réflexions et ouverture** ..... 173
**Conclusion** ..... 174

**Remerciements** ..... 176

**Annexe** ..... 180

**Références** ..... 184

# Liste des figures

Figure 1. Le processus douloureux vu par Descartes. 3
Figure 2. Schématisation des voies nociceptives ascendantes et descendantes. 6
Figure 3. Caractéristiques des différents types de fibres du système nerveux périphérique. 8
Figure 4. Médiateurs pro-inflammatoires périphériques et les différentes familles de récepteurs associés. 12
Figure 5. Étiologie et facteurs contribuant aux nombreuses formes de douleur neuropathique chronique. 14
Figure 6. Illustration des différents types de fibre c (nocicepteurs) présente en périphérie. 16
Figure 7. Types de sensation douloureuse (dysesthésie) et non douloureuse (paresthésie) pouvant être ressentis dans un contexte de syndrome neuropathique. 18
Figure 8. Représentation graphique de la théorie du portillon. 20
Figure 9. Processus cellulaires pouvant menés à la sensibilisation centrale. 22
Figure 10. Effet d'une lésion nerveuse sur l'activation des cellules immunitaires le long de la voie sensitive périphérique. 26
Figure 11. Effet d'une lésion nerveuse périphérique sur les cellules immunitaires de la moelle épinière. 28
Figure 12. Algorithme québécois de traitement de la douleur neuropathique. 29
Figure 13. Illustration schématique des modèles expérimentaux de douleur neuropathique touchant le nerf sciatique et les structures nerveuses périphériques associées. 38
Figure 14. Croissance du nombre de publications relié à la douleur de 1960 à 2009. 42
Figure 15 : Proportion du nombre de publication reliée à la douleur portant sur les opioïdes et les AINS de 1960 à 2009. 42
Figure 16. Représentation graphique du prépropeptide contenant la neurotensine (NT) et la neuromédine N (NN). 48
Figure 17. Représentation schématique des aires du cerveau humain adulte riches en neurotensine. 50
Figure 18. Les récepteurs à la neurotensine NTS1 et NTS2 de rat. 53
Figure 19. Récepteur à la neurotensine NTS3 humain. 54
Figure 20. Distribution régionale des récepteurs à la neurotensine dans le cerveau humain adulte. 57
Figure 21. Séquence peptidique et représentation chimique de la neurotensine. 61
Figure 22. Signalisation intracellulaire des RCPG par les protéines G ou les β-arrestine. 63
Figure 23. Patron développemental de la quantité relative de récepteurs NTS1 et NTS2 dans les cerveaux de rats, souris, lapins et d'Hommes. 154
Figure 24. Efficacité analgésique du JMV2009 en condition de douleur aiguë. 158
Figure 25. Efficacité analgésique du JMV2009 en condition de douleur tonique. 159
Figure 26. Efficacité analgésique du JMV2009 en condition de douleur viscérale. 159

Figure 27. Efficacité analgésique du JMV2009 à moduler l'allodynie mécanique en condition de douleur chronique neuropathique. ..... 160
Figure 28. Efficacité du JMV2009 à moduler certains paramètres de qualité de vie observés dans un modèle de douleur chronique neuropathique..... 161
Figure 29. Effet du JMV2009 sur la régulation de la température corporelle. ..... 162
Figure 30. Effet du JMV2009 sur le développement du phénomène de tolérance analgésique. ..... 163
Figure 31. Résumé des mécanismes endogènes et exogènes menant à l'interférence de l'ARN. ..... 166
Figure 32. Validation de l'efficacité des DsiRNA à moduler l'expression du récepteur NTS2 et sa fonctionnalité en douleur aiguë. ..... 168
Figure 33. Validation de l'efficacité des DsiRNA à moduler la fonctionnalité du récepteur NTS2 dans un contexte de douleur tonique. ..... 168

# Liste des tableaux

Tableau 1 : Comparaison des médicaments prescrit en 1ère et 2e ligne de traitement pour la douleur neuropathique. ..... 30
Tableau 2 : Principaux traitements pharmacologiques de la douleur neuropathique, leurs modes d'actions ainsi que leurs principaux effets secondaires. ..... 31
Tableau 3 : Principaux traitements non pharmacologiques de la douleur neuropathique. ..... 33
Tableau 4. Répertoire de certains modèles de douleurs neuropathiques périphériques, centraux, induits par des médicaments et induits par des maladies, réalisés chez les animaux. ..... 36
Tableau 5 : Description des différents tests comportementaux non-réflexifs ..... 45
Tableau 6. Liste non exhaustive des agonistes neurotensinergiques utilisés au laboratoire avec leur affinité respective pour les récepteurs NTS1 et NTS2. ..... 59

# Liste des abréviations

ADN (Acide DésoxyriboNucléique)
AINS (anti-inflammatoire non-stéroïdien)
AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)
ARN (Acide RiboNucléique)
BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor)
CaMKII (Ca2+/calmodulin-dependent protein kinases II)
CCI (chronic constriction injury)
CGRP (calcitonine gene related peptide)
CREB (C-AMP Response Element-Binding protein)
DN (Douleur neuropathique)
DRG (dorsal root ganglia)
DsiRNA (Dicer-substrate small interfering RNA)
ERK (Extracellular signal-regulated kinases)
IL (interleukine)
INF (interféron)
LTP (long term potentiation)
MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1)
NK1 (neurokinine 1)
NMDA (N-méthyl-D-aspartate)
NT (Neurotensine)
NTS1/2 (récepteur à la neurotensine de type 1/2)
mGluR (metabotropic glutamate receptors)
PAG (periaqueductal gray)
PKA (Protein Kinase A)
PKC (Protein Kinase C)
RVM (restroventral medulla)
RISC (RNA Induced Silencing Complex)
Src kinase (acronyme pour sarcoma)
siRNA (small interfering RNA)
SNC (système nerveux central)
SNP (système nerveux périphérique)
SWB (Static Weight Bearing)
TENS (transcutaneous electrical nerve stimulation)
TNF (tumor necrosis factor)
TrkB (neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2)
TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1)

# Introduction

***Avant propos***

L'introduction qui sera présentée dans les prochaines pages expliquera les bases nécessaires à la compréhension des différents projets que j'ai eus durant mon cheminement doctoral. Je passerai en revue différentes notions de douleur avant de mettre l'emphase sur la neurophysiologie de la douleur neuropathique. Le système neurotensinergique, qui comprend principalement le peptide neuromodulateur appelé neurotensine et deux récepteurs couplés aux protéines G, $NTS_1$ et $NTS_2$, sera ensuite présenté. L'implication reconnue de ce système dans la modulation de différent type de douleur sera discutée afin d'élaborer l'hypothèse générale et mon doctorat ainsi que les objectifs qui en découlent.

En se concentrant sur les effets anti-nociceptifs de la NT, notre groupe de recherche figure parmi les principaux laboratoires ayant cette thématique de recherche comme point central. Le laboratoire d'Elliott Richelson, de la Mayo Clinic en Floride et celui de Thomas Dix, de l'Université Médical de Caroline du Sud, sont les autres laboratoires d'importance qui s'intéressent au système neurotensinergique en lien avec ses effets de modulation de la douleur. Dans le cas de notre laboratoire, l'article du Pr Sarret paru en 2005 dans le *Journal of Neuroscience* a jeté les bases des recherches entamées par le laboratoire. En effet, cet article fait mention de plusieurs des tests comportementaux et des agonistes qui sont utilisés dans les recherches menées par l'équipe du laboratoire. Ces tests ainsi que les agonistes seront décrits plus en détails dans chacun des articles présentés dans ma thèse. Deux articles publiés seront ensuite présentés dans leur forme manuscrite avant publication. La discussion fera le retour sur l'ensemble des résultats contenu dans les articles, en plus de présenter certains résultats obtenus durant ma thèse concernant deux autres projets qui n'ont pas encore fait l'objet de publications. Ces résultats sont ainsi insérés et discutés dans la section discussion afin de dresser un portrait global des recherches effectué dans mon doctorat, sans toutefois alourdir la section introduction qui couvre déjà l'essentiel des notions présenté dans cette thèse.

***La douleur dans l'histoire***

La douleur est sans conteste le problème médical le plus ancien. L'histoire de l'humanité a été façonnée par les symboles philosophiques, politiques et religieux de celle-ci. Avant même de pouvoir mettre des mots sur ses maux, l'Homme a ressenti la douleur et lui a donné de nombreuses significations. La douleur est de plus la métaphore centrale de la pensée judéo-chrétienne ; le test de la foi dans l'histoire de Job. La souffrance a une cause, mais dans ce cas-ci beaucoup plus philosophique que physique, c'est-à-dire la délivrance par la souffrance. Des milliers d'années avant que l'on comprenne le fonctionnement du système nerveux, depuis Hippocrate et la Grèce antique, la douleur est déjà un concept bien présent dans les écrits. Même dans une période de l'humanité où la théorie des *humeurs* faisait loi, la douleur occupait un créneau qui lui était propre et l'on cherchait déjà des façons de la soulager.

Malgré tous les symboles et parfois même l'aspect folklorique que représente la douleur, elle est avant tout un problème médical. Depuis des centaines d'années, les médecins tentent de diminuer les douleurs de leurs patients sans vraiment les comprendre. Parfois on utilisait de l'opium ou une préparation comme le laudanum, alors que d'autres fois on infligeait volontairement de la douleur lorsque « nécessaire » pour retirer les humeurs mauvaises ou amputer un membre malade. Plus récemment, des archéologues ont découvert des tablettes de glaise datant d'environ 5000 av. J-C qui faisait état de la culture et de la consommation de l'opium pour apporter la joie et arrêter les douleurs. Telemachus, le personnage central de l'Odyssée d'Homer, utilisait également l'opium pour soulager ses douleurs et oublier ses inquiétudes. Bien que l'on était conscient de la douleur, peu d'information était disponible pour en comprendre son fonctionnement. Dans son traité de l'Homme, publié en 1664, René Descartes décrit avec beaucoup de détails le corps comme étant une machine complexe (Bell 1824; Descartes et al. 1664). En parlant de ce corps à la troisième personne, il propose pour la première fois qu'il existe un lien entre les sensations périphériques et le cerveau.

**Figure 1. Le processus douloureux vu par Descartes.**
Illustration réalisée par René Descartes montrant le chemin de l'information sensorielle partant de la périphérie pour se rendre jusqu'au cerveau. Tiré de (Bell 1824; Descartes et al. 1664).

Voici un extrait tiré du traité écrit par René Descartes, où il décrit le processus de douleur allant de la périphérie au cerveau.

> « Comme par exemple si le feu A se trouve proche du pié B, les petites parties de ce feu, qui se meuvent comme vous savez tres-promptement, ont la force de mouvoir avec soy l'endroit de la peau de ce pié qu'elles touchent ; & par ce moyen tirant le petit filet c, que vous voyez y estre attaché, elles ouvrent au mesme instant l'entrée du pore d, e, contre lequel ce petit filet se termine ; ainsi que tirant l'un des bout d'une corde, on fait tonner en mesme temps la cloche qui pend à l'autre bout. Or l'entrée du pore ou petit conduit d, e, estant ainsi ouverte, les Esprits Animaux de la concavité F entrent dedans, & font portez par luy, partie dans les muscles qui servent à retirer ce pié de ce feu, partie dans ceux qui servent à tourner les yeux & la teste pour le regarder, & partie en ceux qui servent a avancer les mains & à plier tout le corps pour y apporter du secours. Mais ils peuvent aussi estre portez par ce mesme conduit d, e, en plusieurs autres muscles. Et avant que je m'arreste à vous expliquer plus exactement, en quelle sorte les Esprits Animaux suivent leur cours par les pores du cerveau, & comment ces pores sont disposez, je veux vous parler icy en particulier de tous les sens, tels qu'ils se trouvent en cette machine, & vous dire comment ils se rapportent aux nostres. »

Bien que ce texte nous semble aujourd'hui quelque peu farfelu, il décrit clairement un lien entre la périphérie (le petit filet qui part du pied, soit les nerfs) et le cerveau (Descartes parle alors des Esprits Animaux qui entrent dans les pores du cerveau). Il propose également une analogie simple, mais intéressante, le fil que l'on tire (processus de nociception) pour faire sonner la cloche (intégration centrale de l'information) permet d'illustrer de façon simple la dichotomie nociception/douleur que j'expliquerai plus tard. Descartes propose aussi un mécanisme de réflexe qui permet d'« apporter secours » à l'endroit atteint et qui serait contrôlé par le cerveau. Ce modèle cartésien d'une connectivité rigide et fixe conduisant l'information douloureuse a perduré longtemps sans subir de grandes modifications. Ce modèle a même été renforcé par les études anatomiques du 19e siècle, entre autres celles réalisées par Charles Bell, dont le livre « An exposition of the natural system of the nerves of the human body », publié en 1825 en est un exemple éloquent où il explique en détail la connectivité nerveuse sensorielle et motrice (Navratilova et al. 2013; Bell 1824). Ce n'est que assez récemment que les différentes pièces du casse-tête ont commencé à s'imbriquer pour faire de la douleur un tout beaucoup plus complexe.

***La douleur utile***

Le système nerveux est une merveilleuse machine qui permet de détecter et d'interpréter un nombre impressionnant de stimuli exogènes et endogènes. Lorsque ces stimuli gagnent en intensité, ils génèreront de la douleur. Cette douleur sera par contre modulée en fonction de nombreux paramètres génétiques, physiologiques, environnementaux, psychologiques, etc. La douleur sert avant tout de mécanisme de défense pour le maintien de l'intégrité corporelle. Dans l'éventualité d'une lésion, la douleur perdura durant la période de guérison afin de protéger le corps durant cette période de vulnérabilité. Toutefois, au-delà de cette simple définition, la douleur ne se définit malheureusement pas en une seule phrase. Il est alors important de la détailler dans toute sa complexité. L'humain expérimente la douleur d'une façon complexe et multidimensionnelle. Cette douleur est unique pour chaque individu et c'est pour cette raison que l'on parle généralement d'une « expérience douloureuse » puisqu'une même douleur « théorique » engendrera des réponses différentes pour chacun. Le chemin menant

du stimulus initial à la réponse comportementale qui peut suivre est long et parsemé d'obstacles. Ce dernier sera de prime abord affecté par l'aspect sensitif de la douleur, mais par la suite modulé par les dimensions affectives et cognitives propres à chaque individu (McMahon et al. 2013; Navratilova et al. 2013). Ces dimensions font de la douleur une entité médicale extrêmement difficile à évaluer et encore plus à traiter. En effet, il est virtuellement impossible de procéder à des études avec un échantillon de patients qui représente adéquatement la population globale atteinte de douleur chronique. Bien que ce constat soit vrai pour la plupart des problèmes de santé, il atteint, à mon avis, son apogée dans le cadre de la douleur.

***La douleur dans toute sa complexité***

Avant d'entreprendre la tâche de définir ce qu'est la douleur, il est essentiel de faire la distinction entre douleur et nociception. D'un point de vue séquentiel, la nociception précède la douleur. Il s'agit du processus nerveux acheminant l'information de la périphérie jusqu'au niveau central, soit des terminaisons nerveuses du système nerveux périphérique (SNP) vers les zones sensorielles du cerveau, en passant par la moelle épinière (éléments constituant le système nerveux central, ou SNC). Afin de parler de douleur, il faut que le signal provenant du SNP soit intégré par le cortex cérébral. C'est seulement une fois rendu à ce niveau que l'information nociceptive sera qualifiée de douloureuse ou simplement sensorielle. Il est possible d'avoir de la douleur sans nociception (ex. : maux de tête, douleur neuropathique) comme de la nociception sans douleur (ex. : lésion de la moelle épinière ou des zones cérébrales responsables de l'intégration des influx nerveux). Comme illustré à la figure 2, cette information sensorielle est véhiculée par des voies dites ascendantes, principalement la voie spino-thalamique dans le cas de la douleur. Ces voies sont quant à elles contrebalancées par d'autres voies, dites descendantes, principalement des voies bulbo-spinales. La première classification importante pour catégoriser la douleur se fait au niveau de l'aspect temporel. Elle se range en trois grandes phases, qui sont la douleur aiguë, la douleur tonique (aussi apelé subaiguë chez l'humain) et finalement la douleur chronique (McMahon et al. 2013).

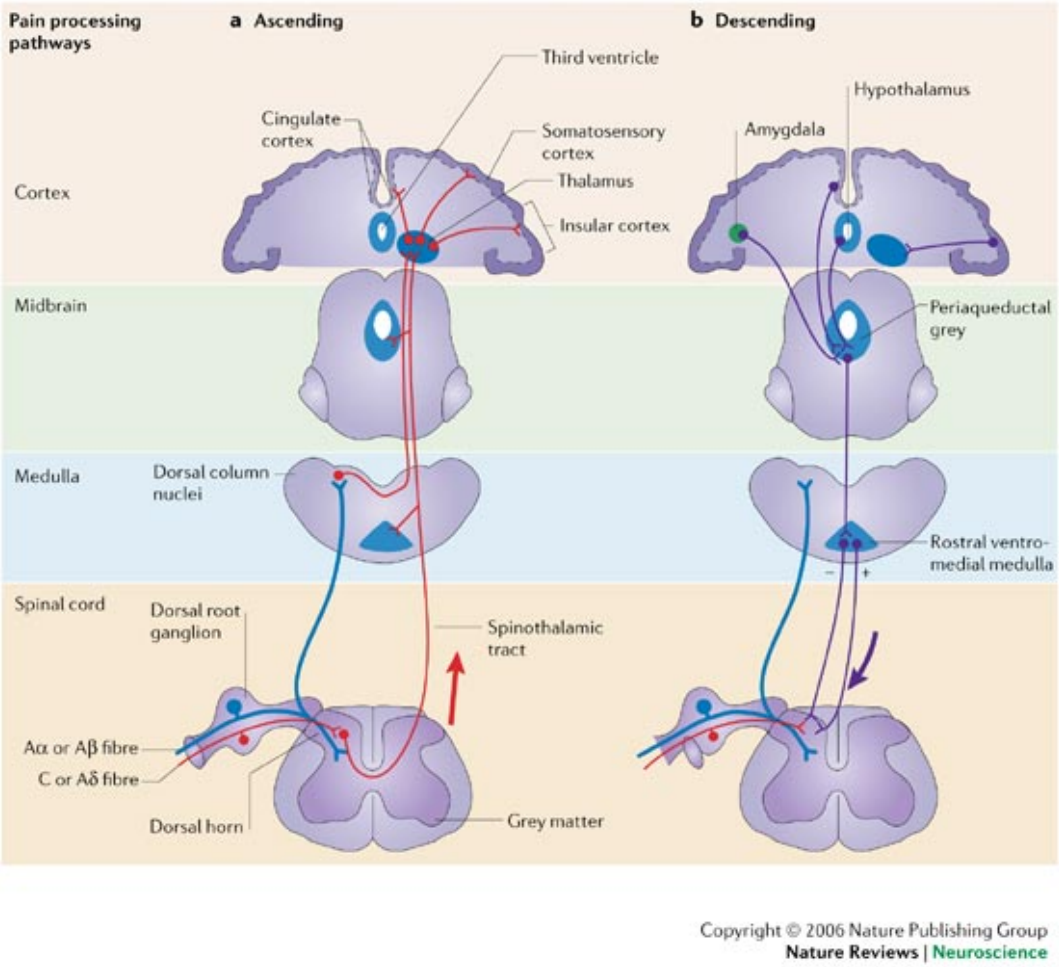



**Figure 2. Schématisation des voies nociceptives ascendantes et descendantes.** La voie nociceptive ascendante est initiée au niveau périphérique par l'activation des fibres C et/ou Aδ (neurones de premier ordre), allant faire synapse avec les neurones de 2$^{e}$ ordre localisés dans la corne dorsale de la moelle épinière. Ces derniers se rendent au niveau du cortex, principalement par la voie spino-thalamique dans un contexte nociceptif, afin de faire synapse avec les neurones de 3$^{e}$ ordre situés dans le thalamus. Ces neurones se projettent alors vers les différentes régions corticales associées au stimulus initial. La voie descendante se partage plutôt en deux sections, la principale voie est de type bulbo-spinale, partant de la substance grise périaqueducale ou de la région bulbaire rostro-ventrale vers la moelle épinière, mais des projections cortico-bulbaires sont également présentes. Tiré de (Basbaum et al. 2009; Mantyh 2006; Treede et al. 1995).

*La douleur aiguë*

La douleur provenant d'une lésion tissulaire directe ou d'un potentiel de lésion est communément appelée douleur aiguë. Comme mentionnée plus haut, cette douleur répond à un fondement biologique bien précis, soit avertir le corps d'une blessure réelle ou

potentielle dans le but d'amorcer un réflexe de protection. Cette douleur initiale répond également à des bases neurologiques de conduction de l'influx nerveux. Tout d'abord, les fibres Aδ, de diamètre moyen (2 à 5 µm), faiblement myélinisées et conduisant l'information de 5 à 30 m/s, seront responsables de la première douleur dans la seconde suivant la lésion (Basbaum et al. 2009; Treede et al. 1995). Par la suite, les fibres C, de petit diamètre (0,2 à 2 µm), non myélinisées et conduisant l'information à un maximum de 2 m/s, seront responsables d'une sensation appelée douleur secondaire, d'intensité moindre que la douleur primaire, mais s'échelonnant sur une plus grande période de temps (de quelques secondes à plusieurs minutes). Les fibres A α et β, de gros diamètres (6 à 12 µm), hautement myélinisées et d'une vitesse de conductions très rapide (35 à 75 m/s) ne participent pas à ces sensations douloureuses mais conduisent plutôt l'information sensorielle non nociceptive (McMahon et al. 2013; Basbaum et al. 2009; Treede et al. 1995). La douleur primaire, aussi appelée douleur rapide, sert à localiser l'endroit qui a été atteint en activant notamment les cortex somatosensoriels S1 et S2, tandis que la douleur secondaire, ou lente, activera le système nerveux autonome sympathique et une réponse de type combat-fuite (mieux connue sous l'acronyme anglophone : « fight or flight ») (McMahon et al. 2013). Cette douleur secondaire activera également de nombreuses les réponses comportementales basées sur les dimensions affective/motivationnelle et cognitive/évaluative par l'activation des zones cérébrales comme le cortex insulaire et préfrontale, impliqué dans l'intégration de ce type d'information (Julius and Basbaum 2001). Il est important de mentionner que la peau, tout comme les organes internes, répond à ces critères, l'innervation externe et interne fait appel aux mêmes fibres et une lésion peut ainsi être autant au niveau de la peau qu'au niveau des organes internes.

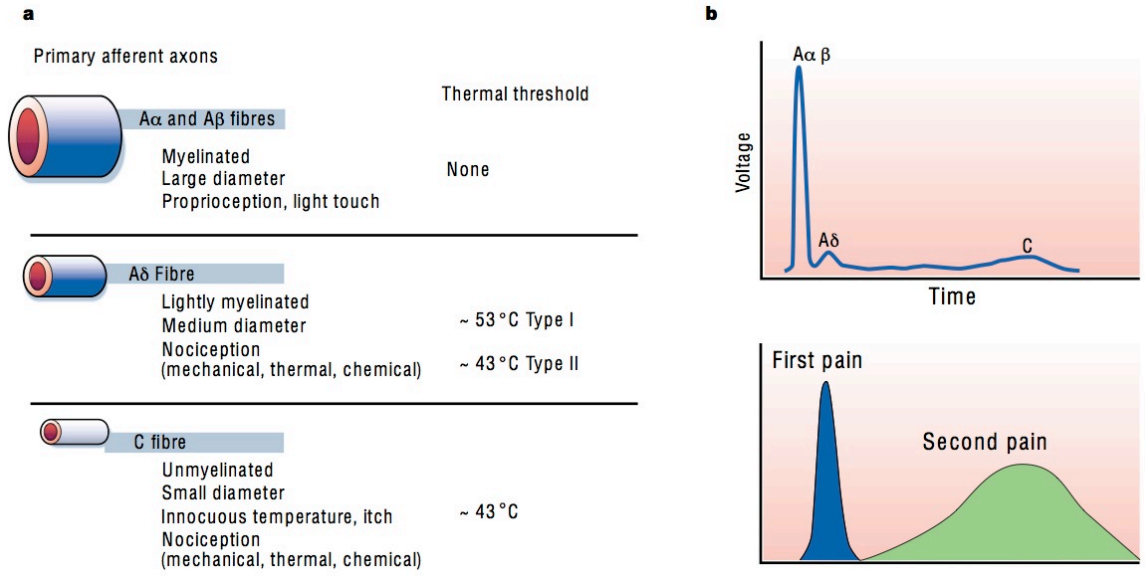



**Figure 3. Caractéristiques des différents types de fibres du système nerveux périphérique.**
Les fibres de gros diamètres et fortement myélinisées sont les plus rapides et conduisent essentiellement l'information sensorielle de type proprioceptive. Les fibres de moyens calibres, faiblement myélinisées, sont quant à elles responsables de la sensation de première douleur et conduisent l'information nociceptive de type thermique, mécanique et chimique. Les fibres de petits diamètres sont les plus lentes et conduisent le même type d'information que les précédentes, mais possèdent des seuils d'activation différents. Tiré de (Jaggi, Jain, and Singh 2009; Julius and Basbaum 2001; D'amour and Smith 1941).

Jusqu'à la fin des années 70, la recherche sur la douleur se concentrait essentiellement sur la douleur aiguë. Ainsi, les seules méthodes comportementales utilisées afin d'évaluer l'efficacité des analgésiques chez le rat étaient d'analyser les réactions face à des stimuli ponctuels et douloureux (Sandkühler 2009; Jaggi, Jain, and Singh 2009; D'amour and Smith 1941). La plupart de ces différents tests existent encore aujourd'hui pour déterminer l'intensité de la douleur aiguë perçue par les animaux. Les plus communs sont le test de retrait de la queue, suite à l'immersion dans un bain d'eau chaude ou l'application d'un rayon chauffant ; le test plantaire, où un faisceau lumineux chauffant est dirigé vers une des pattes arrières de l'animal et le test de la plaque chaude (ou froide) (Wheeler-Aceto and Cowan 1991; Sandkühler 2009). Dans tous les cas, ces tests induisent en premier lieu une réponse de type réflexe (engendré par des mécanismes spinaux) qui sera mesurée en temps de latence (en secondes) avant le comportement attendu. Ces

réponses nociceptives peuvent être modulées avec des analgésiques communs comme la morphine (Siddall and Cousins 2004; Wheeler-Aceto and Cowan 1991; Olesen et al. 2012) et représentent généralement la première étape de criblage dans l'évaluation préclinique d'un nouveau composé analgésique.

*La douleur tonique ou persistante*

La douleur tonique, qui est aussi appelée persistante, correspond à une phase soutenue de moyenne durée (de quelques heures à quelques mois) (Siddall and Cousins 2004; Olesen et al. 2012). Cette phase douloureuse est présente durant la période de guérison de la blessure initiale et devrait normalement s'estomper progressivement jusqu'à atteindre le niveau normal de chaque individu. Les phases de douleur aiguë et tonique peuvent être considérées comme étant de nature physiologique, c'est-à-dire qu'elles constituent essentiellement des phénomènes normaux responsables du maintien de l'homéostasie corporelle tout au long de notre vie. La complication et la progression de ces douleurs dans le temps seront expliquées dans la section suivante décrivant la douleur chronique.

La recherche préclinique a développé certains tests comportementaux permettant d'évaluer l'efficacité analgésique d'une molécule dans un contexte de douleur persistante. Un des tests les plus utilisés est le test à la formaline, consistant en l'injection intraplantaire d'une solution diluée de formaldéhyde qui induira chez l'animal une douleur tonique de type chimique (Blumberg, Wolf, and Dayton 1965; Dubuisson and Dennis 1977; Chernov et al. 1967; Niemegeers, Van Bruggen, and Janssen 1975; Fukawa et al. 1980). Les comportements de l'animal sont alors enregistrés sur une période d'au moins 60 minutes. D'autres modalités d'évaluation pour la douleur tonique existent comme le test de crampes abdominales, dans lequel une solution irritante (acide acétique, chlorure de sodium) est injectée de façon intrapéritonéale chez l'animal et le nombre de crampes est comptabilisé sur un certain laps de temps (Baliki et al. 2012; Blumberg, Wolf, and Dayton 1965; Schwartz et al. 2013; Chernov et al. 1967; Pagé et al. 2013; Niemegeers, Van Bruggen, and Janssen 1975; Deumens et al. 2013; Fukawa et al. 1980; Courtney and Fernández-de-Las-Peñas 2011; Buchheit, Van de Ven, and Shaw 2012). Comme il le sera expliqué en détails

dans les pages suivantes, il est intéressant de mentionner que ce sont les mêmes fibres et neurotransmetteurs qui sont impliqués dans la douleur aiguë, tonique et chronique. Ce sont plutôt les mécanismes de régulations qui sont modulés pour créer différents paradigmes douloureux.

*La douleur chronique*

Si les phénomènes douloureux décrits précédemment (douleur aiguë et persistente) peuvent être considérés comme physiologiques en raison de leur rôle dans le maintien de l'homéostasie corporelle, il arrive également que la douleur puisse devenir pathologique lorsqu'elle perdure dans le temps après la guérison complète de toutes lésions périphériques apparentes. Dans ce cas, la douleur devient une maladie au sens propre du terme et sera qualifiée de chronique, bien que ce type de douleur peut également s'expliqué par des principes physiologiques. Il est évidemment essentiel de savoir contrôler et moduler la douleur physiologique (douleur aiguë et persistente), par exemple lors d'interventions chirurgicales, mais la douleur chronique demeure cependant celle qui constitue le fardeau sociétal le plus important.

La transition de la douleur dite physiologique vers la douleur chronique est un phénomène encore relativement mal connu. De nombreux groupes de recherche basent l'essentiel de leurs efforts à essayer de percer les mystères de ce point d'inflexion crucial dans le développement d'une pathologie douloureuse (Stubhaug 2005; Baliki et al. 2012; McGreevy, Bottros, and Raja 2011; Schwartz et al. 2013; Pagé et al. 2013; Deumens et al. 2013; Courtney and Fernández-de-Las-Peñas 2011; Buchheit, Van de Ven, and Shaw 2012). Une zone floue, encore une fois propre à chaque patient, est présente au moment de la transition entre la fin de la douleur persistante et le début de la douleur chronique. Malheureusement, aucun biomarqueur ou mécanisme fiable n'a encore été découvert afin de trancher si un patient est en voie de développer une douleur chronique ou si ses symptômes sont encore dus au processus de guérison. La découverte future de ce type d'information représentera une avancée considérable dans l'élaboration de stratégies de gestion de la douleur. Des approches sont toutefois en phase exploratoire, notamment le fait de traiter certaines douleurs aiguës ou sub-aiguës (comme les douleurs post-opératoire) par

des traitements médicamenteux agressif, semblent être en mesure de bloquer la transition vers la douleur chronique (Stubhaug 2005; McGreevy, Bottros, and Raja 2011).

Dans la recherche préclinique, la douleur chronique se subdivise en trois grandes familles ayant des critères distinctifs propres. On retrouve de ce fait la douleur inflammatoire, neuropathique et cancéreuse (Honore et al. 2000). Mon projet principal portant sur la douleur neuropathique, je décrirai rapidement les douleurs de types inflammatoire et cancéreuse et je m'attarderai ensuite à l'aspect neuropathique.

La douleur inflammatoire

La douleur inflammatoire chronique est initialement due à une réponse inflammatoire exagérée qui engendrera de la douleur aiguë. Que cette réponse soit, par exemple, la conséquence d'une infection ou d'une maladie auto-immune, il y aura une relâche importante de médiateurs inflammatoires qui contribueront à sensibiliser les nocicepteurs en périphérie des tissus inflammés. Les phénomènes de douleur inflammatoire aiguë peuvent alors perdurer pour entraîner le développement de douleur chronique. Les nocicepteurs sont des récepteurs localisés au niveau des terminaisons nerveuses libres des fibres C et A δ et possèdent différentes modalités d'activation en fonction des stimuli auxquels ils font face (Basbaum et al. 2009; Julius and Basbaum 2001). Parmi les médiateurs inflammatoires, il est possible de retrouver des molécules comme la bradykinine, l'histamine, des peptides issus des cellules immunitaires comme les interleukines (IL) 1, 6, 8, etc., des chimiokines comme la monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), le « tumor necrosis factor alpha » (TNF-α), l'interféron gamma (INF-γ), les leucotriènes, les prostaglandines, etc (Basbaum et al. 2009). Les terminaisons nerveuses elles-mêmes contribuent à cette grande « soupe » inflammatoire en relâchant des neuropeptides comme la substance P et le « calcitonin gene-related peptide » (CGRP) (McMahon, Cafferty, and Marchand 2005; Basbaum et al. 2009). Ces médiateurs, via l'activation de leurs récepteurs/canaux respectifs, induiront une hyperexcitabilité des neurones afférents qui engendrera une douleur continue (G. J. Bennett 2012; McMahon, Cafferty, and Marchand 2005). Cette douleur continue est caractéristique de la douleur

chronique inflammatoire et est à distinguer de la douleur spontanée présente dans la douleur neuropathique (Basbaum et al. 2009; G. J. Bennett 2012).

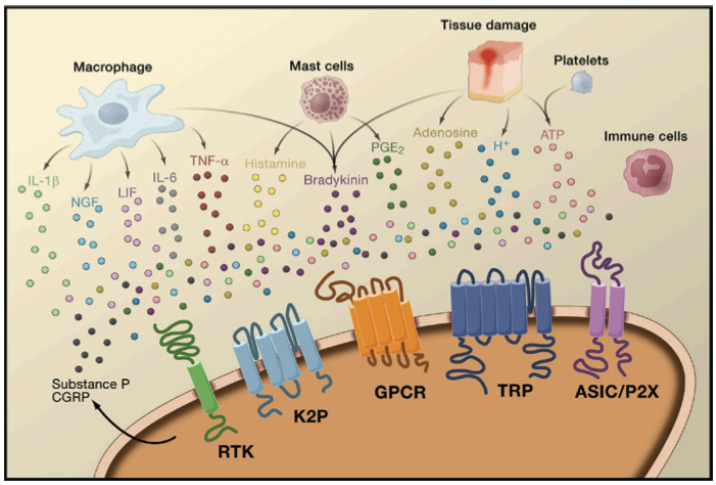



**Figure 4. Médiateurs pro-inflammatoires périphériques et les différentes familles de récepteurs associés.**
Plusieurs types cellulaires sont responsables de la sécrétion périphérique des nombreuses molécules contribuant à la sensibilisation des terminaisons axonales périphériques. Tiré de (Honore et al. 2000; Basbaum et al. 2009).

La douleur cancéreuse

La douleur cancéreuse a été initialement identifiée comme étant de type mixte, c'est-à-dire possédant à la fois les caractéristiques de la douleur inflammatoire (due à la réponse immunitaire causée par la prolifération tumorale) et de la douleur neuropathique (due, entre autres, à la compression nerveuse possible par la masse tumorale) (Honore et al. 2000). Bien que ces composantes soient souvent présentes dans la douleur cancéreuse, des études ont montré que ce type de douleur possédait ses propres caractéristiques, non présentes dans les deux autres types de douleurs. Il est ainsi possible de retrouver une signature neurochimique, au niveau de la moelle épinière et des afférences primaires, propre à chaque type de douleur chronique, incluant la douleur cancéreuse (Delaney et al. 2008; Honore et al. 2000; Kirou-Mauro et al. 2009; Doré-Savard et al. 2010). La douleur cancéreuse sera également très variable en fonction de l'organe cible atteint, certains cancers ne causant pratiquement aucune douleur (certains cancer du cerveau, cancer des bronches, etc.), tandis que d'autres, comme le cancer des os, peuvent induire des douleurs

faisant partie des douleurs les plus difficiles à traiter (Hehn, Baron, and Woolf 2012; Delaney et al. 2008; Kirou-Mauro et al. 2009; Doré-Savard et al. 2010).

La douleur neuropathique

Il est facile de penser que la douleur neuropathique (DN), quelle qu'en soit son étiologie, est un phénomène uniforme. Une atteinte nerveuse mène, de façon linéaire, vers une douleur unique. La réalité est toutefois loin de ce simple paradigme. Par définition, la DN origine du système nerveux (Ueda and Rashid 2003; Hehn, Baron, and Woolf 2012; Dray 2008). La définition exacte de l'Association International d'Étude sur la Douleur (IASP) est la suivante : Douleur causé par une lésion ou une maladie du système nerveux somatosensoriel. Il existe deux façons de classer les DN, soit selon la localisation par rapport au système nerveux touché : périphérique ou central, ou selon la cause : maladie métabolique, atteinte traumatique, infections ou neurotoxines. Toutefois, peu importe la localisation ou la cause, les dommages se présentent sous la forme d'une lésion ou d'une dysfonction affectant le SNP dans une proportion de 90 %, ; les autres cas étant dus à un problème au niveau du SNC (Authier et al. 2009; Ueda and Rashid 2003; Obrosova 2009; Dray 2008; Bhangoo et al. 2007; Jaggi, Jain, and Singh 2009; Tian, Perera, and Moalem-Taylor 2013).

Parmi les causes les plus évidentes, on retrouve les atteintes traumatiques (accidentelle ou chirurgicale), comme une compression ou une lésion, soit d'un nerf périphérique ou de la moelle épinière. Cependant, de nombreuses maladies ou traitements peuvent mener à une atteinte nerveuse, on parlera ainsi de symptômes secondaires dus au diabète, au cancer et certains agents chimiothérapeutiques (vincristine, cisplatine, paclitaxel, etc.), aux infections virales (herpes zoster, VIH, etc.) et certains agents antiviraux (zalcitabine, didanoside, stavudine, etc.), à différentes maladies auto-immunes (sclérose en plaque, syndrome de Guillain-Barré), etc (Apfel et al. 2001; Authier et al. 2009; Boulton et al. 2004; Obrosova 2009; Tesfaye et al. 2010; Bhangoo et al. 2007; Jaggi, Jain, and Singh 2009; Tian, Perera, and Moalem-Taylor 2013). Comme il est détaillé dans la figure 5, ces différentes étiologies peuvent être modulées par de nombreux autres facteurs génétiques et environnementaux ainsi que d'autres problèmes pathophysiologiques

potentiellement déjà présents chez chaque personne. La combinaison de tous ces paramètres culminera en syndromes neuropathiques très variables. En effet, un exemple marquant est l'existence de neuropathies diabétiques qui peuvent être dans certains cas douloureuses tandis que dans d'autres situations, la neuropathie sera au contraire accompagnée d'une hypoesthésie importante (Hehn, Baron, and Woolf 2012; Apfel et al. 2001; Boulton et al. 2004; Tesfaye et al. 2010). Les manifestations cliniques d'une étiologie d'apparence similaire peuvent de ce fait être diamétralement opposées. Ce triste constat vient alors complexifier les avenues de traitements et tend une fois de plus vers la nécessité d'une médecine personnalisée qui serait basée sur plusieurs facteurs en vue de déterminer le traitement optimal.

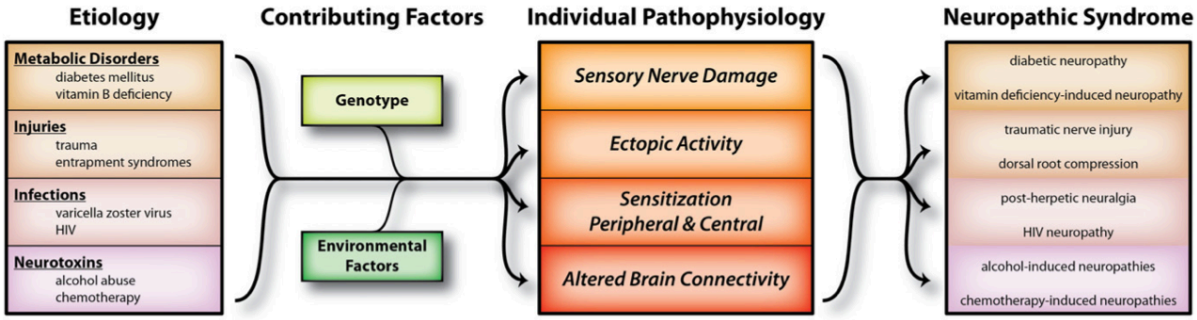



**Figure 5. Étiologie et facteurs contribuant aux nombreuses formes de douleur neuropathique chronique.**
Schéma résumant comment peuvent se développer les différents syndromes neuropathiques, partant de l'étiologie primaire, ensuite modulée en fonction du génotype de chaque individu ainsi que par les facteurs environnementaux présents. L'intégration de tous ces paramètres créera une pathophysiologie propre à chaque individu qui pourra ensuite être classée dans les différents sous-types de syndromes neuropathiques. Tiré de (Hehn, Baron, and Woolf 2012).

D'un point de vie épidémiologique, la DN affecte une proportion variable de personnes, soit de 2 à 3% au niveau mondial, près de 7% au Canada et peut atteindre jusqu'à près de 8 % selon certaines études européennes (Descartes et al. 1664; Torrance et al. 2006; Bouhassira et al. 2008; Moulin et al. 2007). Toutes tendent cependant vers le même constat, la DN affecte des millions de personnes mondialement et représente ainsi un fardeau majeur pour la société, tant au niveau des coûts pour le système de santé qu'en

absentéisme au travail chez la population active (Basbaum et al. 2009; Kennedy 2007; Campbell and Meyer 2006; Hehn, Baron, and Woolf 2012). Afin de diagnostiquer facilement la présence de douleur neuropathique chez un patient, le questionnaire DN4 (pour douleur neuropathique en 4 questions) est l'un des outils disponible pour les cliniciens.

***Neurophysiologie de la douleur neuropathique***

Plusieurs changements neurophysiologiques se produisent durant le développement de la douleur neuropathique. J'expliquerai ici les principaux mécanismes responsables non seulement du développement, mais également du maintien de la DN. On retrouve, entre autres, la sensibilisation périphérique, l'activité ectopique, la sensibilisation centrale et corticale, la modulation descendante et l'implication du système immunitaire et des cellules gliales. Plutôt que de former des entités physiologiques séparées et chronologiquement distinctes, tous ces mécanismes forment un tout expliquant dans son ensemble ce qu'est la douleur neuropathique.

*La sensibilisation périphérique*

Il se produit une sensibilisation périphérique caractérisée par une diminution du seuil d'activation et une augmentation de l'excitabilité des terminaisons périphériques des nocicepteurs. Ces phénomènes s'observent rapidement durant la phase de douleur aiguë et peuvent mener au développement de douleur chronique par la suite. Une des raisons principales des changements de propriété électrique est la modification d'expression, de distribution et d'activité de certains canaux ioniques ou récepteurs-canaux ioniques. Il est important de mentionner que la plupart des nocicepteurs sont de type polymodal (figure 6), c'est-à-dire qu'ils répondent à plusieurs stimuli d'origine thermique, mécanique et chimique.

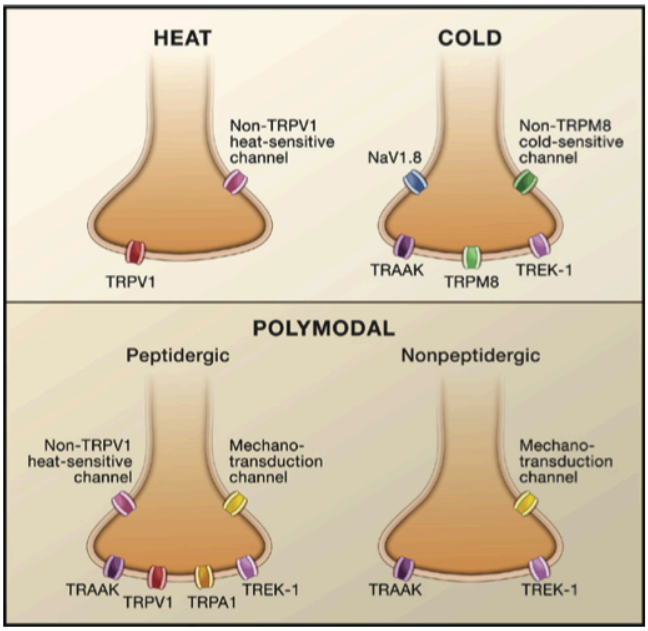



**Figure 6. Illustration des différents types de fibre c (nocicepteurs) présente en périphérie.**
Plusieurs types de canaux sont exprimés sur les nocicepteurs ce qui leur confère des propriétés spécifiques leur permettant de répondre à des stimuli thermique (chaud, ex. : TRPV1 ; froid, ex. : TRPM8), chimique (ex. : TRPA1, ASIC) et mécanique (TREK-1, TRAAK). Tiré de (J. Huang, Zhang, and McNaughton 2006; Basbaum et al. 2009).

Un des principaux canaux impliqués dans ce processus de sensibilisation est le récepteur TRPV1 (pour Transient Receptor Potential Vanilloid 1). Le rôle de ce canal a été bien établi dans un contexte de douleur inflammatoire (Hudson et al. 2001; J. Huang, Zhang, and McNaughton 2006; H. Y. Kim et al. 2008), mais plusieurs études montrent également qu'après une lésion nerveuse, des changements post-traductionnels et de trafic intracellulaire, en plus d'une augmentation de l'expression dans les fibres sensitives non lésées seraient responsables d'une hypersensibilité tissulaire (Coutaux et al. 2005; Hudson et al. 2001; H. Y. Kim et al. 2008). En effet, un des premiers résultats de ces modifications est qu'une stimulation non nociceptive au niveau des tissus innervés par le ou les nerfs atteints sera perçue comme douloureuse (G.-Y. Xu et al. 2011; Coutaux et al. 2005; Shinoda et al. 2007; Eid et al. 2008). Ce phénomène appelé allodynie peut être, à l'instar des nocicepteurs impliqués, polymodal, c'est-à-dire qu'il est possible d'obtenir une allodynie thermique, mécanique ou encore chimique. D'autres processus neurophysiologiques, qui seront discutés plus loin, participent aussi au développement de

l'allodynie. La sensibilisation périphérique entraînera également un autre phénomène douloureux, appelé hyperalgésie, c'est-à-dire qu'une stimulation qui était initialement légèrement douloureuse sera perçue, après sensibilisation périphérique, comme plus douloureuse. D'autres canaux ioniques ont le potentiel d'affecter les propriétés électriques des fibres afférentes, parmi lesquels des membres de la famille des TRP, comme le TRPA1 ou TRPM8 (sous-famille A ou M et membre 1 ou 8) ou encore d'autres appartenant aux récepteurs purinergiques, comme le P2X3. Leurs contributions respectives à l'hypersensibilité observée dans la DN restent encore à clarifier, mais ils représentent néanmoins de potentielles cibles thérapeutiques (Hehn, Baron, and Woolf 2012; G.-Y. Xu et al. 2011; Amir, Kocsis, and Devor 2005; Shinoda et al. 2007; Eid et al. 2008). L'aspect thérapeutique de ces récepteurs reste toutefois complexe puisque leur modulation affecte la perception normale des sensations thermiques, ce qui peut entraîner des problèmes en raison de la perte du signal d'alarme causé par la chaleur ou le froid.

*L'activité ectopique des fibres nerveuses*

L'activité ectopique des fibres nerveuses est un problème important, mais difficile à évaluer et à traiter. En effet, une douleur qui survient sans aucun stimulus externe est particulièrement débilitante et difficile à tolérer. Ces activités ectopiques peuvent apparaître virtuellement tout au long du chemin nociceptif, bien que ces sensations spontanées, après une lésion nerveuse, semblent être le résultat de l'hyperexcitabilité des neurones sensoriels primaires, ce qui mène au déclenchement de potentiels d'actions ectopiques au site de la blessure (Rasminsky 1980; Hehn, Baron, and Woolf 2012; Amir, Kocsis, and Devor 2005). Ces activités ectopiques mèneront principalement à deux phénomènes sensitifs, soit la paresthésie et la dysesthésie (figure 7), le premier n'étant pas en tant que tel une sensation douloureuse, mais plutôt désagréable comme un engourdissement ou des picotements. Par contre, la dysesthésie peut engendrer des sensations comme une décharge électrique, un coup de poignard ou une brûlure, manifestations physiologique qui seront perçues comme étant douloureuses. L'altération de l'intégrité nerveuse peut également conduire à un phénomène neurophysiologique appelé éphapse, caractérisé par un point de contact latéral entre des fibres nerveuses où une décharge électrique peut être transmise directement à travers les axones sans faire appel à une synapse (Djouhri et al. 2006; Rasminsky 1980; Wu

et al. 2002). Ces manifestations électriques sont ainsi des acteurs importants dans la propagation d'activité ectopique puisqu'une fibre non lésée peut soudainement déclencher un potentiel d'action nociceptif contribuant à la DN (Liu et al. 2000; Djouhri et al. 2006; Devor 2009; Wu et al. 2002; Berger et al. 2011; Hehn, Baron, and Woolf 2012).

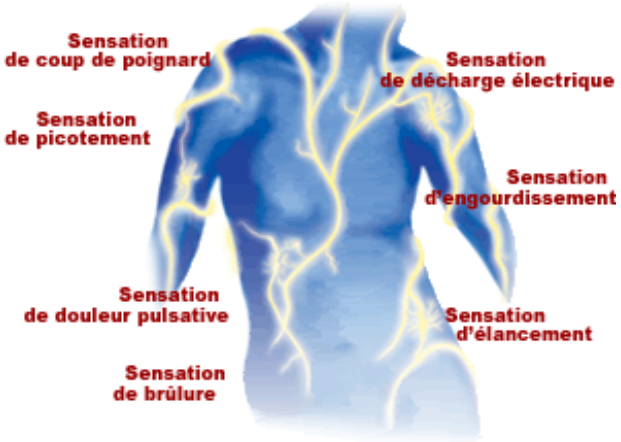



**Figure 7. Types de sensation douloureuse (dysesthésie) et non douloureuse (paresthésie) pouvant être ressentis dans un contexte de syndrome neuropathique.**
Tirée du site internet de Pfizer : http://www.nepknowmore.ca/

Une lésion nerveuse altère grandement l'expression, la distribution et la phosphorylation de plusieurs canaux ioniques au niveau des neurones sensitifs. Ces changements induisent une modification des propriétés intrinsèques des membranes et la génération d'oscillation du potentiel membranaire qui aura pour conséquence de créer, en l'absence de stimulus, des rafales rythmiques de décharge (Woolf 1983; Liu et al. 2000; Devor 2009; Berger et al. 2011; Hehn, Baron, and Woolf 2012). Le but ici n'est évidemment pas de faire une revue complète du rôle joué par chacun des canaux ioniques, mais plutôt d'illustrer la complexité derrière la modulation de ces canaux et l'avantage d'avoir des cibles pharmacologiques ne faisant pas intervenir ces acteurs qui jouent un rôle clé dans les fonctions de base des neurones. En ciblant d'autres systèmes, il est possible d'éviter les effets indésirables au niveau du SNC, mais également au niveau cardiaque, qui pourraient survenir en modulant la fonction de ces canaux.

*La sensibilisation centrale*

La découverte du phénomène de sensibilisation centrale remonte au début des années 80 (Latrémolière and Woolf 2009; Woolf 1983; Ohnami et al. 2011; Ruscheweyh et al. 2011) et a permis un profond changement dans la compréhension de l'établissement des douleurs chroniques. La sensibilisation centrale est une forme de plasticité synaptique de longue durée localisée au niveau de la moelle épinière et déclenchée initialement par les nocicepteurs. La sensibilisation centrale est ainsi dépendante d'une décharge soutenue de ces nocicepteurs, ce qui permettra l'établissement d'une potentialisation homo- et hétérosynaptique. La potentialisation homosynaptique possède plusieurs points en commun avec le phénomène appelé potentialisation à long terme (ou LTP pour « Long-Term Potentiation ») (Teyler 1987; Latrémolière and Woolf 2009; Ohnami et al. 2011; Ruscheweyh et al. 2011), bien connu dans les processus de formation de la mémoire (Molander and Grant 1986; Teyler 1987; Krenz and Weaver 1998). Toutefois, la facilitation hétérosynaptique est quelque peu différente puisque cette dernière fait intervenir, comme son nom l'indique, les synapses de différents types de fibres afférentes, principalement les fibres Aβ et C. En effet, dans le contexte de sensibilisation centrale, les terminaisons synaptiques des fibres Aβ bourgeonnent dans les laminae superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière, où elles créeront des synapses avec les neurones de 2$^{e}$ ordre recevant normalement leur informations des fibres C (Woolf, Shortland, and Coggeshall 1992; Molander and Grant 1986; Krenz and Weaver 1998). Ce processus de bourgeonnement hétérosynaptique est l'autre principale raison pour laquelle une stimulation périphérique non douloureuse (donc activant les fibres Aβ) peut générer une sensation douloureuse (de l'allodynie) puisque ces fibres proprioceptives peuvent maintenant emprunter le chemin des fibres nociceptives de type C. Le bourgeonnement périphérique est initialement bon afin de rebrancher les axones périphériques endommagés à leurs cibles normales. Par contre, en augmentant leur capacité intrinsèque de croissance, les neurones peuvent bourgeonner au niveau de la moelle épinière, créant les problèmes décrits plus haut, et entraînant au final probablement plus de problèmes qu'ils en règlent (Melzack and Wall 1965; Woolf, Shortland, and Coggeshall 1992).

Parmi les théories modernes de la douleur, une des plus importantes est celle décrite par un scientifique montréalais, soit Ronald Melzack et autre anglais, Patrick D. Wall. Leur théorie du portillon (ou « gate control » en anglais), publié en 1965 (Melzack and Wall 1965), est encore tout à fait d'actualité et représente un acteur important dans le phénomène de sensibilisation centrale. En effet, les interneurones inhibiteurs présents dans la moelle épinière relâchent en temps normal des neurotransmetteurs inhibiteurs (principalement le GABA et la glycine) afin de diminuer le niveau de transmission nociceptive provenant des nocicepteurs. En condition de douleur chronique, une désinhibition se produit, pouvant créer une hyperalgésie subséquente.

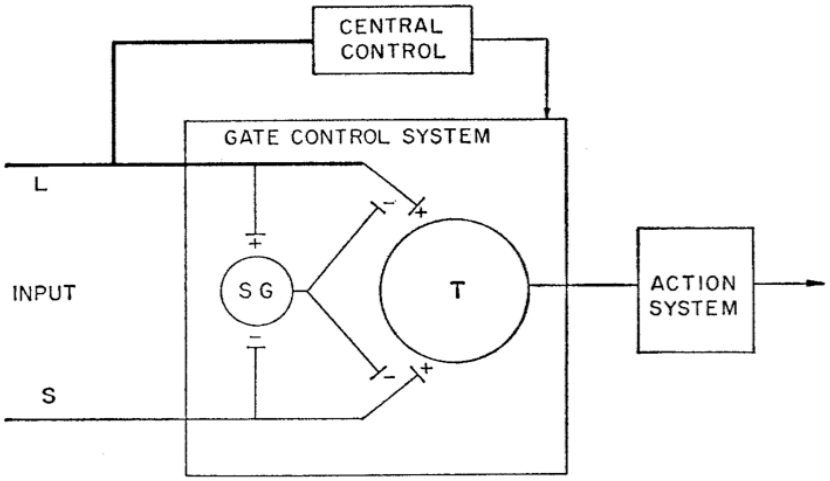



**Figure 8. Représentation graphique de la théorie du portillon.**
Cette théorie propose que les fibres de large diamètre (L, fibres A), autant que les fibres de petit calibre (S, fibres C) font synapse avec les interneurones présents dans la *substantia gelatinosa* (SG) et avec les premières cellules centrales de transmission (T). Les interneurones de la SG inhibent la transmission subséquente des cellules T, et cette inhibition est soit potentialisée par l'activation des fibres L, soit diminuée par l'activation des fibres S. Les fibres L induisent ainsi un contrôle central qui permet de moduler la sortie finale d'information nociceptive se rendant aux centres supérieurs. +, excitation ; -, inhibition. Tiré de (Latrémolière and Woolf 2009; Melzack and Wall 1965; Ohnami et al. 2011).

D'un point de vue mécanistique, la sensibilisation centrale induit des changements autant au niveau post- que présynaptique. Ces changements s'opèrent principalement au niveau de la régulation des récepteurs ionotropiques et des canaux calciques voltage-dépendants responsable de l'efflux de calcium, ou encore par le relargage des réserves

intracellulaires de calcium suite à l'activation des récepteurs métabotropiques ou de type tyrosine kinase (Asiedu et al. 2011; Latrémolière and Woolf 2009; Katano et al. 2011; Ohnami et al. 2011; Miletic et al. 2011). Tous ces mécanismes de régulation du calcium intracellulaire tendent vers une signalisation produisant des changements transcriptionnels et post-traductionnels de plusieurs protéines effectrices, modulant leur niveau d'expression, leur distribution ainsi que leur activité fonctionnelle (D'Mello et al. 2011; Asiedu et al. 2011; Hu and Gereau 2011; Katano et al. 2011; Latrémolière and Woolf 2009; Miletic et al. 2011; Nozaki et al. 2011). En résumé, parmi les joueurs clés responsables des modifications synaptiques qui sous-tendent la sensibilisation centrale, il est possible de retrouver les récepteurs glutamatergiques NMDA, AMPA et mGluR, le récepteur à la substance P NK1, le récepteur du BDNF TrkB, ainsi que plusieurs protéines effectrices comme les kinases CaMKII, PKA et PKC, src, ERK, le facteur de transcription CREB, et plusieurs autres (Latrémolière and Woolf 2009; D'Mello et al. 2011; Hu and Gereau 2011; Nozaki et al. 2011). En tenant compte du nombre impressionnant de protéines impliquées dans la sensibilisation centrale, il est maintenant aisé de comprendre que des différences génotypiques interindividuelles, même si elles sont minimes, peuvent induire un risque très variable de développer des douleurs neuropathiques, mais également peut faire varier la réponse aux traitements.

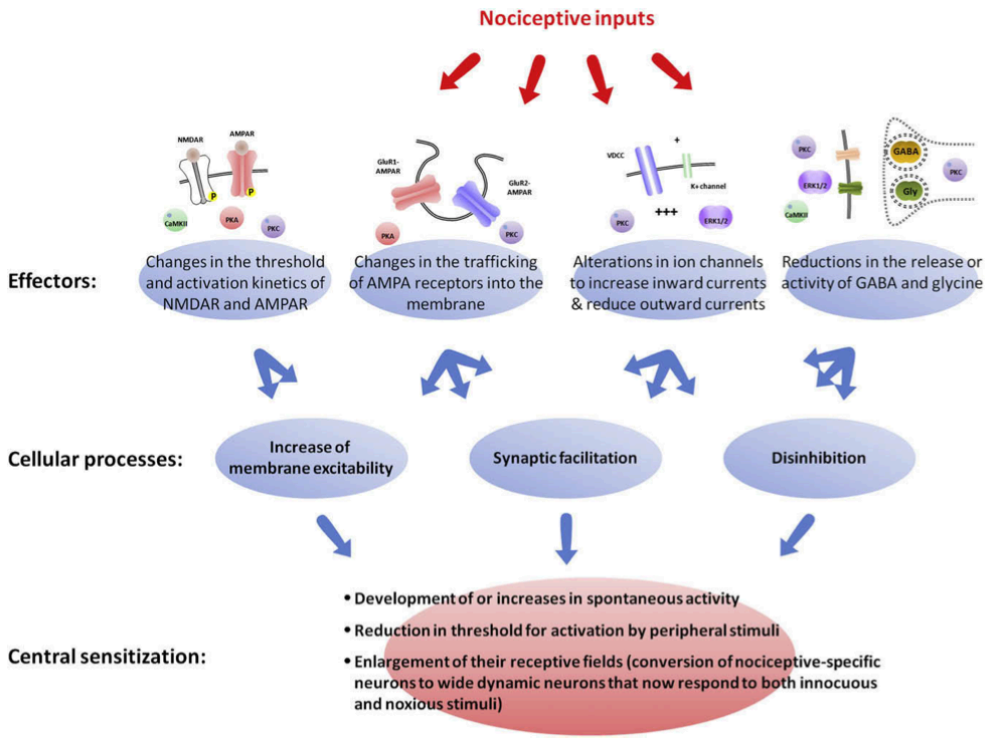



**Figure 9. Processus cellulaires pouvant menés à la sensibilisation centrale.** Une stimulation nociceptive répétée conduira à une modulation de plusieurs protéines et molécules effectrices. Ces modifications causeront différents problèmes comme une augmentation de l'excitabilité membranaire, une facilitation synaptique et une désinhibition. Ces différents phénomènes cellulaires sont responsables du développement de la sensibilisation centrale et des troubles sensoriels associés. Tiré de (Apkarian 2011; Latrémolière and Woolf 2009; Clarke and Lawrence 2013).

*Modification des régions corticales impliquées dans la douleur*

La sensibilisation centrale ne touche toutefois pas uniquement la moelle épinière. Il est possible d'observer des changements importants au niveau supérieur du SNC. Ces changements s'effectueront principalement dans les régions constituant ce qu'on appelle la matrice de la douleur. Bien que ce terme soit parfois critiqué, différents groupes de recherche tentent toujours de déterminer la réelle composition et le rôle de cette matrice (Moisset and Bouhassira 2007; Apkarian 2011; Clarke and Lawrence 2013). Nous pouvons cependant affirmer que certaines régions, qui sont maintenant reconnues de façon sûre pour être impliquées dans l'intégration et la modulation de la douleur, peuvent subir des changements synaptiques similaires à ceux observés dans les cornes dorsales de la moelle épinière. Il est alors possible de retrouver six régions principales, soit les cortex

somatosensoriels primaire et secondaire (S1 et S2), le cortex insulaire (ou insula), le thalamus, le cortex cingulé antérieur (CCA) et le cortex préfrontal (CPF) (Fu et al. 2008; Moisset and Bouhassira 2007; Pedersen, Scheel-Krüger, and Blackburn-Munro 2007; Baliki et al. 2012; Apkarian 2011; Metz et al. 2009; Brightwell and Taylor 2009). Cependant, des études récentes impliquent d'autres régions du cerveau, notamment l'amygdale, reconnue pour son rôle dans les dimensions affectives/émotionnelles de la douleur, le noyau accumbens, plus particulièrement sa connexion avec le CPF, qui serait important dans la transition de la douleur aiguë vers la douleur chronique et le locus coeruleus (Brooks and Tracey 2005; Fu et al. 2008; Kennedy 2007; Pedersen, Scheel-Krüger, and Blackburn-Munro 2007; Costigan, Scholz, and Woolf 2009; Baliki et al. 2012; Apkarian 2011; Metz et al. 2009; Brightwell and Taylor 2009). De plus, l'amygdale, tout comme l'hypothalamus, sont également définie comme des régions importantes dans la modulation descendante puisque de nombreuses voies ont comme point d'initiation ces deux régions corticales (Moulton et al. 2011; Brooks and Tracey 2005; Kennedy 2007; Costigan, Scholz, and Woolf 2009). Une étude récente implique également le cervelet dans le processus aversif de la douleur (Apkarian, Hashmi, and Baliki 2011; Moulton et al. 2011; Tracey 2011; Schweinhardt et al. 2006; Baliki et al. 2011). D'autres études montrent une modification de l'état de repos du cerveau chez des patients souffrant de douleur spontanée et on observe des différences d'activation cérébrale selon la présence d'une douleur aiguë ou chronique ou encore selon l'induction d'un même stimulus chez des patients sains ou souffrant de douleur chronique (Baliki et al. 2011; Apkarian, Hashmi, and Baliki 2011; Tracey 2011; Schweinhardt et al. 2006). Il a été montré qu'une diminution régionale du volume de la matière grise pouvait survenir chez des patients atteints de douleur chronique neuropathique. Toutefois, ces modifications semblent variables selon le type de DN et représentent alors probablement le phénotype douloureux propre à chaque individu (Millan 2002; Baliki et al. 2011; Tracey 2011). Les modifications supra-spinales pouvant survenir en cas de douleur chronique représentent un degré de complexité supplémentaire qui peut, en partie, expliquer les difficultés rencontrées par les cliniciens pour soulager leurs patients.

*Modulation descendante*

Un des mécanismes régulateurs importants de contrôle de la douleur est l'inhibition descendante provenant des centres supérieurs. Des noyaux importants sont localisés au niveau du tronc cérébral, principalement dans la substance grise périaqueducale (SGPA ou PAG, pour *periaqueductal gray*) ainsi que dans la région bulbaire rostro-ventrale (RVM, pour *rostroventral medulla*) et contiennent des populations neuronales qui font synapse avec les terminaisons des nocicepteurs et les interneurones présents dans les laminae superficielles de la moelle épinière. Ces neurones relâchent localement des neurotransmetteurs, comme les opioïdes endogènes, qui activeront notamment les interneurones inhibiteurs, ce qui permetra une diminution de l'influx nociceptif vers les centres supérieurs (Bee and Dickenson 2008; Millan 2002; Vera-Portocarrero et al. 2006). Toutefois, en condition neuropathique, un changement s'opère dans ce système complexe de contrôle inhibiteur descendant et le résultat net est un signal sérotoninergique descendant qui induit une facilitation de la douleur, plutôt que l'inhibition initiale (Leong et al. 2011; Bee and Dickenson 2008; Vera-Portocarrero et al. 2006). De plus, il a été observé dans un modèle animal qu'une perte neuronale dans la région du tronc cérébral peut survenir après une lésion nerveuse périphérique, indiquant que cette lésion peut induire une apoptose à différents niveaux de l'axe neural (G. J. Bennett 1999; Leong et al. 2011; Campbell and Meyer 2006).

*Implications immunitaire et gliale en périphérie*

Bien que les DN ne soient pas, en général, d'origine inflammatoire, il est possible d'observer malgré tout une forte implication du système immunitaire dans les processus de développement et de maintien de la DN (G. J. Bennett 1999; Campbell and Meyer 2006). Suite à une lésion nerveuse, une importante infiltration de macrophages survient à l'endroit de la lésion, mais également dans les ganglions de la racine dorsale (DRG pour « Dorsal Root Ganglia ») où réside le soma des neurones afférents (figure 10). Cette infiltration fournit une source importante de médiateurs pro-inflammatoires qui pourront agir directement sur les neurones sensoriels. Les macrophages et les lymphocytes qui seront recrutés de façon subséquente communiquent entre eux, mais également avec les neurones, les cellules de Schwann et les cellules satellites des DRG via un langage constitué de

cytokines et de chimiokines (Calvo, Dawes, and Bennett 2012; Costigan, Scholz, and Woolf 2009; Hehn, Baron, and Woolf 2012). Cette communication stimulera l'expression des récepteurs aux cytokines (ex. : TNFR, récepteur du TNF-α) et aux chimiokines (ex. : CCR2, récepteur de la CCL2 (ou MCP-1)) par les DRG, ce qui, globalement, participera à la sensibilisation des fibres lésées, mais également des fibres saines adjacentes (F. A. White, Jung, and Miller 2007; Calvo, Dawes, and Bennett 2012). De cette façon, la MCP-1 et son récepteur, le CCR2, sont surexprimés dans les DRG et dans la moelle épinière suivant une atteinte nerveuse. Par la suite, l'interaction entre CCR2 et certains membres des récepteurs TRP, notamment TRPA1 et TRPV1, permettra leur transactivation et contribuera alors à la sensibilisation des nocicepteurs, faisant du couple MCP-1/CCR2 un acteur important dans la genèse de la DN au niveau périphérique (Basbaum et al. 2009; F. A. White, Jung, and Miller 2007). Ces phénomènes sont à différenciés de l'inflammation neurogène, qui fait plutôt appel à des mécanismes intrinsèques aux neurones comme une relâche de substance P et de CGRP (Basbaum et al. 2009).

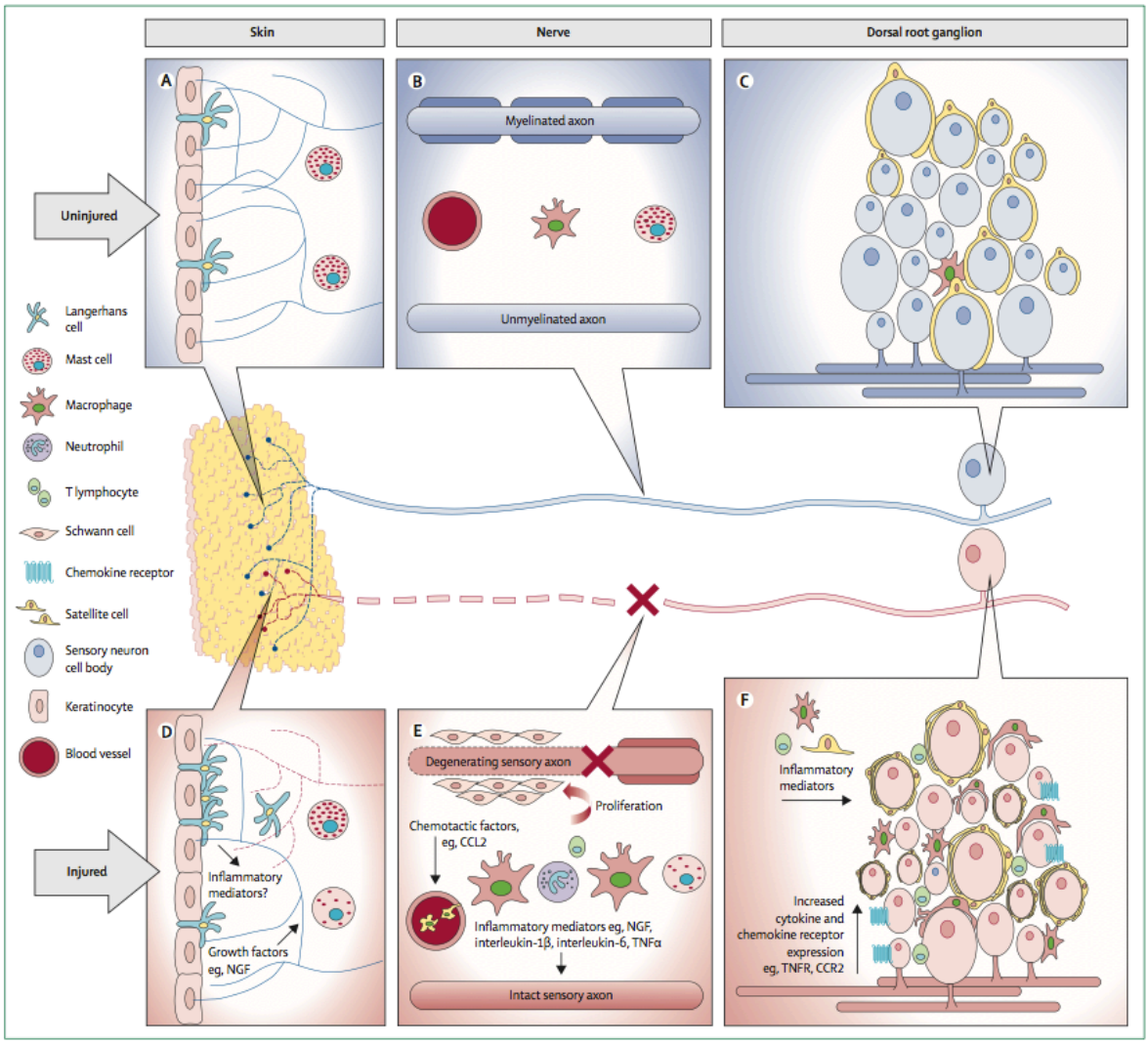



**Figure 10. Effet d'une lésion nerveuse sur l'activation des cellules immunitaires le long de la voie sensitive périphérique.**
Des cellules immunitaires résidentes sont présentes au niveau de la peau (A), des nerfs (B) et des DRG (C), où elles scrutent les tissus afin de détecter rapidement la présence d'un dommage. Lorsqu'une atteinte nerveuse périphérique est décelée, ces cellules vont libérer de nombreux médiateurs inflammatoires afin d'activer et de recruter d'autres cellules immunitaires aux différents sites tissulaires (D-F). Ces multiples phénomènes entraîneront la sensibilisation des fibres lésées, en plus des fibres intactes à proximité, ce qui pourrait alors contribuer aux différentes manifestations sensitives anormales qui accompagnent les lésions nerveuses périphériques (activité ectopique, hyperesthésie, …). Tiré de (Beggs and Salter 2007; Calvo, Dawes, and Bennett 2012; Scholz et al. 2008).

*Implications immunitaire et gliale au niveau central*

Un phénomène similaire à celui décrit précédemment se produit au niveau du SNC, mais avec des acteurs légèrement différents. Dans la moelle épinière, les cellules microgliales (les macrophages résidents du SNC) et les astrocytes seront rapidement activés à la suite d'une lésion périphérique, de façon préférentielle en périphérie des terminaisons centrales des afférences affectées (LeBlanc et al. 2011; Beggs and Salter 2007; Leong et al. 2011; Scholz et al. 2008; Ren and Dubner 2008). Cette microgliose suite à une lésion périphérique peut même être observée jusqu'à des zones supra-spinales comme le thalamus, la PAG et la RVM (Saab, Waxman, and Hains 2008; LeBlanc et al. 2011; Suter et al. 2007; Leong et al. 2011; Ren and Dubner 2008). Dans tous les cas, les cellules microgliales relâcheront plusieurs modulateurs immunitaires, qui altèreront les fonctions neuronales et contribueront à induire, mais également à soutenir la DN (Milligan, Sloane, and Watkins 2008; Saab, Waxman, and Hains 2008; Suter et al. 2007). Par exemple, la fractalkine (CXC3CL1) est exprimée par les neurones et les astrocytes, tandis que son récepteur, le CX3CR3 est quant à lui exprimé sur les microglies, suggérant une étroite communication chimiokinergique entre ces différents types cellulaires, surtout dans un contexte de surexpression du système (Orhan, Onal, and Ulker 2010; Milligan, Sloane, and Watkins 2008; Scholz et al. 2008). Plusieurs autres couples agonistes/récepteurs participent à la régulation immunitaire de la DN, ce qui fait des cellules immunitaires périphériques et des cellules microgliales des cibles thérapeutiques intéressantes. En effet, différents traitements immunosuppresseurs ont montré une certaine efficacité dans des modèles animaux de DN, bien que ces traitements n'aient pas d'effet analgésique en soi (Calvo, Dawes, and Bennett 2012; Orhan, Onal, and Ulker 2010; Scholz et al. 2008). Cependant, il demeure incertain que ce type de traitement soit facilement applicable à l'humain. Les thérapies précliniques ciblant ces mécanismes immunitaires et gliaux semblent mieux fonctionner lorsqu'ils sont appliqués rapidement après le dommage nerveux, suggérant un rôle plus important de ces mécanismes dans l'induction de la DN plutôt que dans le maintien. Cette fenêtre thérapeutique temporelle étant très courte, il est alors difficile de l'appliquer dans un contexte humain où la DN est souvent détectée bien après l'installation des modifications neurophysiologiques.

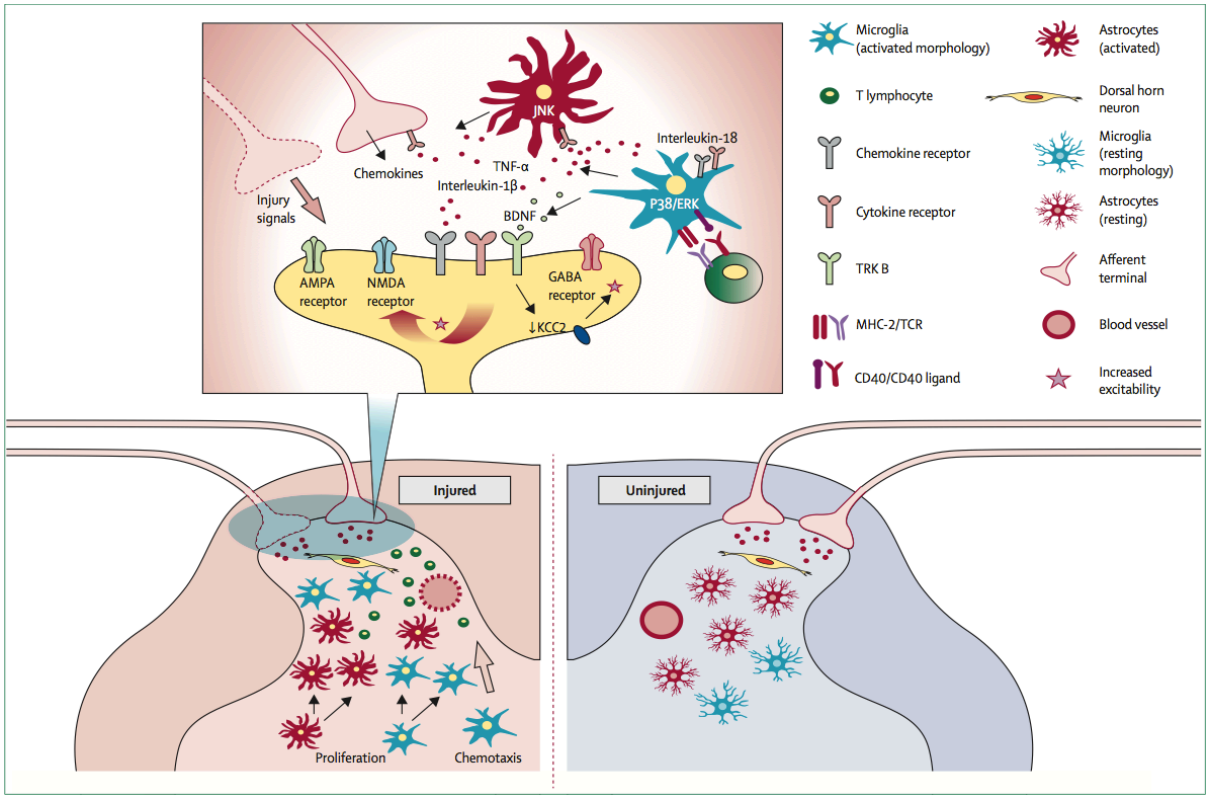



**Figure 11. Effet d'une lésion nerveuse périphérique sur les cellules immunitaires de la moelle épinière.**
En cas de lésion périphérique, les projections axonales périphériques terminant dans les cornes dorsales de la moelle épinière relâcheront plusieurs facteurs, incluant des cytokines (ex. : CCL2, CCL21), des protéases (ex. : MMP-9, cathepsine-S), des facteurs de croissance (ex. : neuregulin-1) et des purines comme l'ATP. Ces signaux stimulent ensuite la prolifération et le chimiotactisme de la microglie et des astrocytes vers la région de la corne dorsale recevant les projections des afférences primaires lésées. Ces différents types cellulaires relâcheront d'autres cytokines et chimiokines conduisant à l'augmentation globale de la relâche de neurotransmetteurs menant à une amplification de l'activité des récepteurs excitateurs. Au final, l'ensemble de ces changements causera une excitation accrue et un état d'hypersensibilité. Tiré de (Boulanger 2008; Calvo, Dawes, and Bennett 2012).

### *Traitement actuel de la douleur neuropathique*

#### *Traitements pharmacologiques*

Un groupe québécois de spécialistes en douleur a élaboré en 2008 un algorithme de traitement de la DN (Boulanger 2008). Dans ce texte de recommandation, quatre lignes de traitement sont proposées en fonction de l'efficacité du traitement et de l'intensité de la

douleur ressentie par le patient. Ainsi, selon cet algorithme, il est recommandé de prescrire un médicament de première ligne de prime abord et d'ajouter ponctuellement un opioïde ou le tramadol à courte durée d'action pour les épisodes de douleur intense. Dans le cas d'une inefficacité de soulagement, il est alors préconisé d'ajouter ou de remplacer par un autre médicament jouant sur un autre paramètre de la douleur avant d'augmenter de façon trop importante la dose en monothérapie. En tout temps, il est important de suivre non seulement l'évolution de la douleur, mais surtout le développement d'effets secondaires. Si l'ajout d'un nouvel agent ne permet pas d'atteindre l'effet escompté, un sevrage doit être effectué avant de passer aux médicaments des lignes successives ou de substituer pour un autre médicament (Boulanger 2008). Cet algorithme de traitement n'a pas changé sepuis sa parution en 2008, mais une mise à jours sera réalisé prochainement, de même que l'algorithme canadien (communication personelle avec Dre Aline Boulanger).

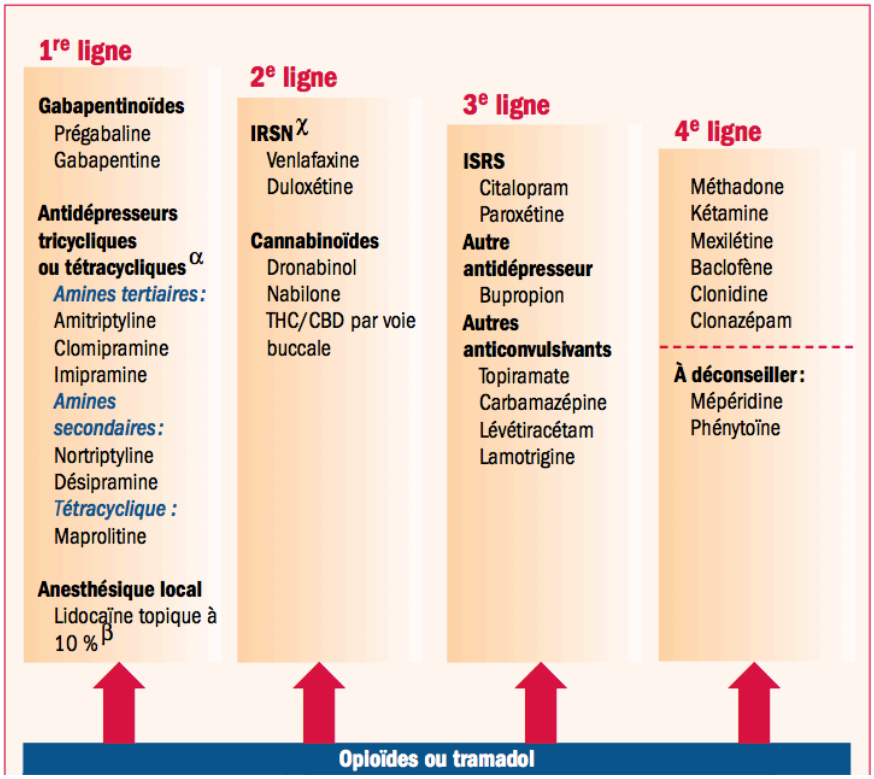



**Figure 12. Algorithme québécois de traitement de la douleur neuropathique.**
Les traitements disponibles au Québec pour traiter la douleur neuropathique se répartissent en quatre lignes distinctes selon la puissance du composé et l'importance des effets secondaires potentiels. À tous moments, des opioïdes ou du tramadol peuvent être prescrits

afin de combattre les douleurs épisodiques. Tiré de (O'Connor and Dworkin 2009; Boulanger 2008).

Il est intéressant de constater que les lignes de traitement peuvent être variable d'un pays à l'autre et même au sein du Canada par rapport au Québec. Une revue parue en 2009 relate les principales différences entre les lignes de traitements présentes au Canada, aux Etats-Unis et en Europe (tableau 1). On constate par exemple que les ISRSN sont prescrits en 1ère ligne aux Etats-Unis, mais en 2e ligne au Canada (incluant le Québec) et en Europe. Des différences sont présentes entre le reste du Canada et le Québec pour la Lidocaïne topique (2e ligne au Canada et 1ère au Québec) et pour les opioïdes et le tramadol (3e ligne au Canada et au besoin à toutes les lignes au Québec).

**Tableau 1 : Comparaison des médicaments prescrit en 1ère et 2e ligne de traitement pour la douleur neuropathique.**
Tiré et traduit de (B. Xu et al. 2012; O'Connor and Dworkin 2009; Boulanger 2008; Attal 2012)

| Classe de médicament | Recommandation du NeuPSIG | Recommandation de la CPS | Recommandation de la EFNS |
|---|---|---|---|
| Antidépresseur tricyclique | 1ère ligne | 1ère ligne | 1ère ligne pour PND, NPH, DC |
| Ligand du canal Calcique α2-δ (Gabapentine et pregabaline) | 1ère ligne | 1ère ligne | 1ère ligne pour PND, NPH, DC |
| ISRSN (uloxetine et venlafaxine) | 1ère ligne | 2e ligne | 2e ligne |
| Lidocaïne topique | 1ère ligne pour DN périphérique localisée | 2e ligne pour DN périphérique localisée | 1ère ligne |
| Opioïdes | 2e ligne, excepté dans des circonstances particulières | 3e ligne | 2e ligne-3e ligne pour PND, NPH, DC |
| Tramadol | 2e ligne, excepté dans des circonstances particulières | 3e ligne | 2e ligne-3e ligne pour PND et NPH |

CPS = Canadian Pain Society; DC = Douleur centrale; DN = Douleur Neuropathique; EFNS = European Federation of Neurological Societies; ISRSN = Inhibiteur Sélectif de la Recapture de la Sérotonine et de la Norépinéphrine; NeuPSIG = Neuropathic Pain Special Interest Group; NPH = Neuropathie Post-Herpétique; PND = Polyneuropathie Douloureuse

Dans tous les cas, les médicaments disponibles se répartissent en cinq grandes classes, où l'on retrouve les antidépresseurs, les anticonvulsivants, les agonistes

opioïdergiques, les agonistes cannabinoïdergiques et finalement les thérapies topiques. Le tableau suivant résume les principaux médicaments disponibles pour traiter la DN

**Tableau 2 : Principaux traitements pharmacologiques de la douleur neuropathique, leurs modes d'actions ainsi que leurs principaux effets secondaires.**
Adapté de (Kennedy 2007; B. Xu et al. 2012; Goss, Goins, and Glorioso 2007; Boulanger 2008; Attal 2012)

| Classes de médicaments | Mode d'action des molécules | Effets secondaires principaux |
|---|---|---|
| **Antidépresseurs** | | |
| Amitriptyline<br>Désipramine<br>Nortriptyline<br>Maprolitine<br>Duloxetine<br>Venlafaxine | Inhibiteur de la recapture de la sérotonine et/ou de la norépinéphrine | Centraux: fatigue, sédation, baisse de la vigilance, confusion, anxiété. Périphériques: vision trouble, constipation, nausées, dysurie, tremblements, gain pondéral, hypotension, dysfonctionnement sexuel |
| **Anticonvulsivants** | | |
| Gabapentine<br>Pregabaline | Ligand de la sous-unité α2-δ des canaux sodiques voltage-dépendant, diminution de la relâche de glutamate, norépinéphrine et de substance P | Étourdissement, somnolence, œdème périphérique, confusion, bouche sèche, vision trouble, ataxie, céphalée, nausées, gain pondéral, myoclonies, dystonie, astérixis |
| Lacosamide | Inhibition des canaux sodiques voltage-dépendant, diminution de la relâche de neurotransmetteur présynaptique | Somnolence, nausées, tremblement, maux de tête, fatigue |
| **Agonistes Opioïde** | | |
| Morphine<br>Oxycodone<br>Méthadone<br>Fentanyl<br>Codéine | Principalement des agonistes du récepteur aux opioïdes μ | Nausées, vomissements, somnolence, étourdissement, constipation, diaphorèse, prurit, myoclonie, dépression respiratoire, hyperalgésie aux opioïdes, hypogonadisme |
| **Agonistes Cannabinoïdes** | | |
| Dronabinol<br>Nabilone<br>THC/CBD (voie buccale) | Agonistes des récepteurs aux cannabinoïdes CB1 et CB2 | Baisse de la concentration, hypotension, bouche sèche (irritation buccale), étourdissements |
| **Thérapie topique** | | |
| Timbre de Lidocaine (5%) | Bloqueur des canaux sodiques | Érythème local, démangeaisons, éruption cutanée |
| Timbre de capsaïcine à forte concentration (8%) | Agoniste sélectif du canal TRPV1, induisant un dommage local des nocicepteurs, bloquant la nociception | Érythème local, douleur |

| | | |
|---|---|---|
| Toxine botulique (injection sous-cutanée) | Inhibition de l'exocytose de neurotransmetteur, principalement l'acétylcholine, mais également la substance P et le CGRP | Douleur à l'injection, peu d'effet systémique ou topique rapporté |

Toutefois, malgré tous les traitements pharmacologiques disponibles pour les patients, moins de 50% d'entre eux réussissent à atteindre un seuil de soulagement adéquat (B. Xu et al. 2012; Kennedy 2007; Devulder, Richarz, and Nataraja 2005; Goss, Goins, and Glorioso 2007; Sullivan and Ballantyne 2012; de Leon-Casasola 2013). Leur inefficacité vient principalement du fait que certaines formes de DN ne répondent pas aux analgésiques classiques. De plus, dans de nombreux cas, les effets secondaires encourus (décrits dans le tableau 2) sont trop importants par rapport au soulagement produit par ces mêmes traitements. Cela entraîne alors un nombre considérable de patients à arrêter leur médication (B. Xu et al. 2012; Devulder, Richarz, and Nataraja 2005; Sullivan and Ballantyne 2012; de Leon-Casasola 2013).

*Traitements non pharmacologiques*

Afin de pallier aux limites pharmacologiques, différentes méthodes non pharmacologiques sont également disponibles. Elles sont divisées le plus souvent en trois grandes classes : les thérapies psychologiques, les traitements de type physique et les approches neurochirurgicales. L'essentiel de ces techniques est résumé dans le tableau suivant.

**Tableau 3 : Principaux traitements non pharmacologiques de la douleur neuropathique.**
Tiré de (Nicholson and Verma 2004; B. Xu et al. 2012; Chapman, Tuckett, and Song 2008; Lumley et al. 2011).

| Classification | Name |
|---|---|
| **Psychocorporal treatment** | Cognitive and behavioral techniques |
| | Operant behavioral therapy |
| | Self-hypnosis training |
| **Physical treatment** | Massages |
| | Joint mobilization |
| | Transcutaneous electrical nerve stimulation |
| | Repetitive transcranial magnetic stimulation |
| | Acupuncture |
| **Neurosurgical techniques** | |
| Ablation | Nerve avulsion or section |
| | Dorsal rhizotomy |
| | Spinal dorsal root entry zone lesions |
| | Spinothalamic tractotomies |
| | Thalamotomies |
| | Cingulotomy |
| | Frontal lobotomy |
| | Destruction of the primary sensory cortex |
| Neuromodulation | Periperal nerve stimulation |
| | Spinal cord stimulation |
| | Deep brain stimulation |
| | Motor cortex stimulation |

La première classe correspond à des approches de type psychologique. Comme les douleurs chroniques sont souvent associées à des problèmes d'anxiété, de dépression et de trouble de qualité de vie générale, il est important d'améliorer la perception que peut avoir le patient de sa douleur et de lui donner des façons de changer son comportement face à elle. Comme il a été expliqué dans plus haut, de nombreuses régions corticales connues pour intégrer des informations émotives sont impliquées dans le décodage des douleurs chroniques. C'est ainsi que l'aspect biopsychosocial de la douleur, comme l'anxiété, le stress et la dépression entre en jeu et peut alors moduler à la hausse ou à la baisse la réelle perception de la douleur que peut avoir chaque individu (Nicholson and Verma 2004; Chapman, Tuckett, and Song 2008; Lumley et al. 2011). Les thérapies cognitives et

l'hypnose sont des méthodes ayant démontré une certaine efficacité (Sluka et al. 2013; Mobily, Herr, and Kelley 1993; Frischenschlager and Pucher 2002; Jensen et al. 2005; Jensen et al. 2008). En améliorant le profil psychologique d'un patient, une diminution concomitante de la douleur est souvent observée. La seconde classe contient principalement les méthodes faisant appel à la physiothérapie, allant de la massothérapie jusqu'à l'acuponcture, en passant par des méthodes de stimulation nerveuse électrique transcutanée. Bien que cette dernière méthode, communément appelée TENS (pour Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation), a démontré des résultats contradictoires dans la littérature (Sluka and Walsh 2003; Sluka et al. 2013), elle représente une alternative intéressante qui repose sur des bases neurophysiologiques solides (Willer, Bouhassira, and Le Bars 1999; Sluka and Walsh 2003). En effet, le TENS peut s'effectuer de deux façons, faisant appel à différents mécanismes neuronaux. On retrouve le TENS de type acuponcture (faible fréquence, haute intensité), où des impulsions de fortes amplitudes sont données afin d'activer les voies d'inhibitions descendantes de la douleur (Melzack and Wall 1965; Willer, Bouhassira, and Le Bars 1999; Sluka and Walsh 2003), et le TENS classique (haute fréquence, faible intensité), où de faibles impulsions sont données afin d'activer les interneurones inhibiteurs de la moelle épinière, comme expliqué dans la théorie du portillon (B. Xu et al. 2012; Melzack and Wall 1965; Sluka and Walsh 2003). La troisième classe de traitement non pharmacologique est la plus invasive puisqu'elle fait intervenir des approches chirurgicales. L'ablation directe de certaines régions, ciblées comme problématiques, est utilisée en dernier recours chez des patients souffrant de douleur violente et chez qui les autres méthodes (tant pharmacologiques que non pharmacologiques) ont été essayées sans succès. Il existe une seconde approche chirurgicale qui est moins invasive. Dans ce cas-ci, le neurochirurgien procède à l'implantation d'une électrode de stimulation directement aux sites de modulation de la douleur, soit au niveau périphérique, ou encore au niveau de la moelle épinière ou du cerveau. De façon très simplifié, cette approche fait, entre autre, appel à des mécanismes similaires de contrôle de la douleur qu'il est possible d'activer avec le TENS, mais plus proche des fibres nerveuses impliquées (Jaggi, Jain, and Singh 2009; B. Xu et al. 2012).

***Modèles animaux de douleurs neuropathiques***

Pour des raisons éthiques évidentes, la recherche sur la douleur doit souvent passer par une phase préclinique complète et rigoureuse. Depuis près de 40 ans, plusieurs modèles animaux ont vu le jour. Au début, ces modèles ont été utilisés pour évaluer les phénomènes de nociception aiguë. Par la suite, les chercheurs se sont rendus à l'évidence que la douleur aiguë, bien qu'importante pour le maintien de l'intégrité physique, n'est pas celle qui affecte le plus la qualité de vie des gens. La douleur vraiment invalidante et qui devient une pathologie en elle-même est la douleur chronique. En effet, c'est la douleur persistante, que ce soit la douleur chronique inflammatoire, neuropathique ou cancéreuse, qui affecte le plus les patients. À la lumière de ce constat, de nombreux modèles animaux de douleurs chroniques ont été développés. Le projet présenté ici s'intéresse particulièrement aux modèles murins, plus précisément chez le rat, de douleur chronique neuropathique. Le tableau suivant illustre de façon détaillée la plupart des modèles animaux de douleur neuropathique. Il est alors possible de classer ces différents modèles dans quatre grandes classes qui sont les douleurs neuropathiques périphériques (numéro : 1 à 13, 25 et 26), centrales (numéro : 14 à 17), induites par des maladies (numéro :19 à 22) et finalement induites par des médicaments ou autres composés (numéro : 18, 23, 24 et 27) (Jaggi, Jain, and Singh 2009).

**Tableau 4. Répertoire de certains modèles de douleurs neuropathiques périphériques, centraux, induits par des médicaments et induits par des maladies, réalisés chez les animaux.**
Tiré de (Galluzzi 2007; Jaggi, Jain, and Singh 2009).

| S. no. | Name of model | Principle of injury | Species |
|---|---|---|---|
| 1 | Axotomy (complete sciatic nerve transection) | Complete transection of sciatic nerve | Rats |
| 2 | Chronic constriction injury | Four loose ligatures around sciatic nerve | Rats, mice |
| 3 | Partial sciatic nerve ligation (Seltzer Model) | Tight ligation of one-third to half of sciatic nerve | Rats, mice |
| 4 | Spinal nerve ligation | (i) Tight ligation of L5, L6 spinal nerves<br>(ii) tight ligation of L7 spinal nerve | Rats,<br>*Macaca fascicularis* |
| 5 | Spared nerve injury | Axotomy of tibial and common peroneal nerves | Rats, mice |
| 6 | Tibial and sural nerve transection | Axotomy of tibial and sural nerves | Rats |
| 7 | Ligation of common peroneal nerve | Ligation of common peroneal nerve | Mice |
| 8 | Sciatic cryoneurolysis | Freezing of the sciatic nerve | Rats |
| 9 | Caudal trunk resection | Resection of caudal trunk | Rats, mice |
| 10 | Sciatic inflammatory neuritis | Injection of zymosan, HMG, TNF-alpha around sciatic nerve | Rats, mice |
| 11 | Cuffing-induced sciatic nerve injury | Implantation of polyethylene cuff around sciatic nerve | Rats, mice |
| 12 | Photochemical-induced sciatic nerve injury | Thrombosis in small vessels supplying sciatic nerve by photosensitizing dye and laser | Rats, mice |
| 13 | Laser-induced sciatic nerve injury | Radiation mediated reduction in blood supply to sciatic nerve | Rats |
| 14 | Weight drop or contusive spinal cord injury | Dropping a weight over the exposed spinal cord | Rats, mice |
| 15 | Excitotoxic spinal cord injury | Intraspinal injections of excitatory amino acids | Rats, mice |
| 16 | Photochemical spinal cord injury | Thrombosis in blood vessels supplying the spinal cord by photosensitizing dye and laser | Rats |
| 17 | Spinal hemisection | Laminectomy of T11–T12 segments. | Rats |
| 18 | Drugs-induced | | |
| (a) | Anti-cancer agents (vincristine, cisplatin, oxaliplatin, paclitaxel) | Direct injury of drugs to the nerves of peripheral nervous system | Rats, mice, guinea pigs |
| (b) | Anti-HIV agents (2,3-dideoxycytidine, didanosine) | | Rabbits, rats |
| 19 | Diabetes-induced neuropathy | Persistent hyperglycemia-induced changes in the nerves | Rats, mice |
| (a) | Streptozotocin-induced | | |
| (b) | Genetic models | | |
| 20 | Bone cancer pain models | | |
| (a) | Femur, calcaneus,tibial, humerus bone cancer pain | Inoculation of cancerous cells into respective bones | Rats, mice |
| (b) | Neuropathic cancer pain | Growing a tumor in vicinity of sciatic nerve | Mice |
| (c) | Skin cancer pain | Injection of melanoma cells in plantar region of hind paw | Mice |
| 21 | HIV-induced neuropathy | Delivery of HIV-1 protein gp120 to sciatic nerve | Rats |
| 22 | Post-herpetic neuralgia | | |
| (a) | Varicella Zoster virus | Injection of viral infected cells in the footpad | Rats, mice |
| (b) | Herpes simplex virus | Depletion of capsaicin-sensitive | |
| (c) | Non-viral model | Afferents with resiniferotoxin | Rats |
| 23 | Chronic ethanol consumption/withdrawal | Administration of ethanol over extended period (around 70 days) | Rats |
| 24 | Pyridoxine-induced | Administration of high dose pyridoxine for long period | Dogs, rats |
| 25 | Trigeminal Neuralgia | Compression of trigeminal ganglion<br>chronic constriction injury to infra-orbital nerve | Rats<br>Rats |
| 26 | Orofacial pain | Injection of formalin, carragenan into temporomandibular joints and maxilla | Rats, mice |
| 27 | Acrylamide-induced | Administration of acrylamide for prolonged period | Rats |

*Modèles périphériques de douleur neuropathique*

La douleur neuropathique périphérique est l'une des classes de neuropathie les plus fréquentes dans la société (Huntoon and Burgher 2009; Galluzzi 2007). Cette forme de douleur neuropathique se présente sous différents types. Toutefois, à des fins de simplification et comme mes projets de doctorat ont porté principalement sur la douleur neuropathique périphérique de type traumatique, je m'attarderai à décrire plus en détails les modèles qui y sont liés. Ces douleurs surviennent principalement à la suite d'accidents ou d'interventions chirurgicales, causant une compression ou une lésion nerveuse. On les observe plus fréquemment au niveau des nerfs des membres inférieurs, bien que ce type de neuropathie puisse également atteindre les membres supérieurs et le visage (G. J. Bennett and Xie 1988; Huntoon and Burgher 2009; Seltzer, Dubner, and Shir 1990; Wall et al. 1979). La plupart des modèles animaux de douleur neuropathique périphérique traumatique se concentrent au niveau du nerf sciatique (Klusakova and Dubovy 2009; G. J. Bennett and Xie 1988; Seltzer, Dubner, and Shir 1990; Wall et al. 1979) en raison de sa grande taille et sa facilité d'accès. Du à cette grande taille et à sa localisation, ce nerf est d'autant plus un site souvent atteint chez les patients, que ce soit suite à une lésion traumatique comme une fracture ou que ce nerf soit atteint par une neurotoxicité médicamenteuse, virale, etc. La figure ci-dessous illustre les principaux modèles de douleur neuropathique impliquant une lésion nerveuse de type physique.

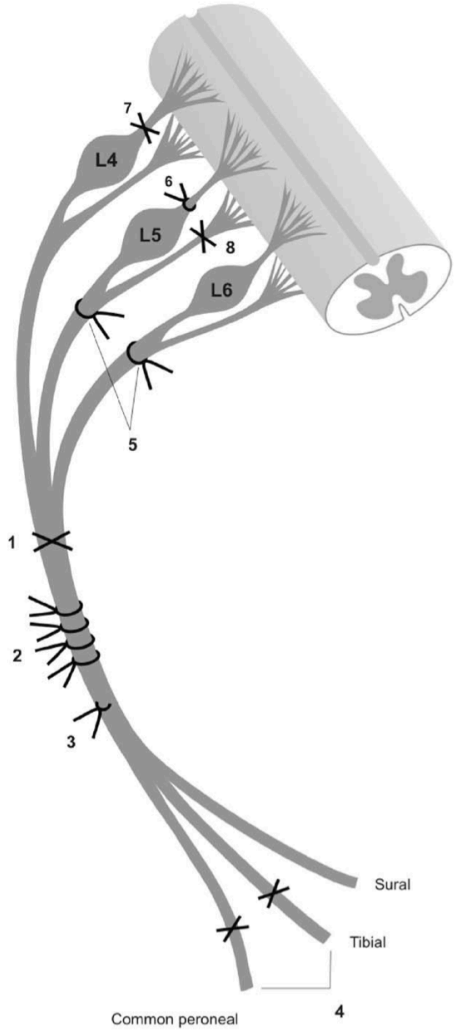



**Figure 13. Illustration schématique des modèles expérimentaux de douleur neuropathique touchant le nerf sciatique et les structures nerveuses périphériques associées.**
Tiré de (G. J. Bennett and Xie 1988; Klusakova and Dubovy 2009).

Dans la plupart des cas, il s'agit de réaliser une ou plusieurs ligatures à l'aide d'un fil de suture sur les nerfs périphériques innervant les pattes arrières de l'animal. Un des modèles les plus utilisés est celui développé par le groupe de Bennett en 1988. Il consiste en une constriction chronique du nerf sciatique (CCI pour Chronic Constriction Injury, numéro 2 sur le schéma) où quatre ligatures lâches sont réalisées, en amont de la trifurcation menant aux nerfs sural, fibulaire et tibial. Cette chirurgie induit par la suite de l'hyperalgésie, de l'allodynie et de la dysesthésie (Mosconi and Kruger 1996; G. J. Bennett

and Xie 1988). Ce modèle était intéressant puisqu'il est moins invasif que le précédent modèle de transsection complète du nerf sciatique, développé par Wall en 1974 (numéro 1 sur le schéma), tout en donnant des résultats aussi pertinents et surtout plus proche de la réalité clinique. C'est ce modèle qui a été privilégié dans le cadre de mon doctorat puisque c'est l'un des plus étudiés et des mieux caractérisés d'un point de vue comportemental et pharmacologique. Toutefois, le modèle a subi une légère modification pour mes expériences en ce qui a trait au type de fil de suture. En effet, le fil utilisé dans le modèle initial (du « chromic gut ») est reconnu pour induire une légère inflammation. Afin de minimiser cette composante inflammatoire dans mes expériences, un fil de suture biologiquement neutre (du prolène) a été utilisé en remplacement.

Bien que le modèle de Bennett soit encore largement utilisé, il est fréquent d'observer une variabilité d'une chirurgie à l'autre et encore plus d'un expérimentateur à un autre. Afin de pallier à ce problème, le groupe de Kruger, à Los Angeles, a développé une méthode de constriction plus facilement reproductible (Seltzer, Dubner, and Shir 1990; Mosconi and Kruger 1996). En effet, l'implantation d'un manchon (« cuff » en anglais) de diamètre contrôlé sur le nerf sciatique induit des phénomènes douloureux similaires au modèle de Bennett, mais en diminuant la possibilité de variabilité induite par le manipulateur. Entre temps, de nombreux autres modèles ont été développés, toujours dans la région du nerf sciatique. Sans les nommer tous, on retrouve une ligature partielle du nerf sciatique (S. H. Kim and Chung 1992; Seltzer, Dubner, and Shir 1990) (numéro 3 sur le schéma), une ligature des nerfs spinaux L5, L6 (Carlton et al. 1994; S. H. Kim and Chung 1992) (numéro 5 sur le schéma) ou L7 (Decosterd and Woolf 2000; Carlton et al. 1994) (chez le primate), une axotomie des différentes subdivisions du nerf sciatique, soit tibial et fibulaire commun (B. H. Lee et al. 2000; Decosterd and Woolf 2000) (numéro 4 sur le schéma) ou tibial et sural (DeLeo et al. 1994; B. H. Lee et al. 2000) ou encore des modèles particuliers comme une cryoneurolyse, qui consiste à geler une partie du nerf sciatique (Tabo et al. 1999; DeLeo et al. 1994). D'autres groupes se sont également intéressés à réaliser des modèles avec une ou deux ligatures en aval du DRG L5 (Lombard et al. 1979; Tabo et al. 1999) (numéro 6 sur le schéma), ou encore une radicotomie dorsale au niveau de L4 (L. Li et al. 2002; Lombard et al. 1979) (numéro 7 sur le schéma), ou ventrale au niveau

de L5 (Walczak et al. 2005; L. Li et al. 2002) (numéro 8 sur le schéma). Ces modèles nécessitent toutefois une procédure chirurgicale légèrement plus complexe que les modèles s'intéressant au nerf sciatique.

Il est également important de mentionner que la plupart des modèles touchant le nerf sciatique entraînent des troubles moteurs. En effet, le nerf sciatique transmettant des informations tant sensorielles que motrices, une lésion de ce nerf induit une rétroflexion et une légère perte de tonus de la patte atteinte. Pour pallier à cet inconvénient, des modèles strictement sensitifs ont été développés, comme celui du groupe de Pierre Beaulieu de l'Université de Montréal (Kissin 2010; Walczak et al. 2005) où de 30 à 50 % du nerf saphène, véhiculant uniquement de l'information sensorielle, est ligaturé. Le but ici n'est pas de faire une énumération exhaustive de tous les modèles existants, mais plutôt de comprendre la pertinence de ces différents modèles. Le but ultime des modèles animaux est évidemment de mimer une DN humaine. Comme mentionné plus haut, il existe de nombreuses étiologies et un seul modèle animal ne peut prétendre représenter tous les types de DN humaine. Dans une optique idéale de médecine personnalisée, chaque DN humaine aurait son propre modèle animal pour valider l'efficacité des meilleurs analgésiques préalablement à sa prescription chez l'humain. Cet idéal est évidemment impossible, mais les nombreux modèles animaux disponibles tentent malgré tout de répondre aux différentes variations observées chez l'humain. Les modèles animaux ont ainsi leurs limites et la validation finale d'une cible thérapeutique doit inévitablement passer par des études cliniques rigoureuses.

***Problématique de recherche***

Maintenant que la douleur neuropathique a été détaillée de façon relativement complète, il est temps de parler de la problématique générale derrière ma thèse de doctorat. Depuis quelques années, le monde de la douleur se questionne quant à son incapacité de mettre sur le marché de nouvelles molécules analgésiques efficaces et ayant moins d'effets secondaires que les traitements actuels. Devant ce triste constat, la question évidente à se poser est toute simple : pourquoi? Pourquoi tant d'argent et de temps investis dans la recherche en neuropharmacologie de la douleur pour si peu de résultat tangible? Il faut tout

de même admettre que les nombreuses recherches des dernières années ont permis de raffiner notre connaissance de la douleur et de son fonctionnement. En effet, tous les mécanismes et phénomènes décrits plus haut sont issus de recherches qui ont favorisé un essor considérable dans la compréhension de la physiopathologie de la douleur chronique. Malgré tout, peu de traitements sont aujourd'hui disponibles et surtout aucun n'est véritablement basé sur les cibles thérapeutiques potentielles identifiées dans la littérature. Dans une revue récente, le Dr Igor Kissin de l'Université Harvard fait mention de ce problème (Kissin 2010). Ainsi, depuis les 50 dernières années, 59 médicaments ont été introduits sur le marché comme étant des molécules analgésiques. De celles-ci, moins de 12% portaient sur des cibles considérées comme nouvelles et seulement une sur les 59, le sumatriptan, utilisé pour diminuer les migraines, s'est avérée suffisamment efficace pour motiver la recherche d'autres médicaments sur cette cible (Campbell et al. 2006; Kissin 2010). Bien que le nombre de publications en douleur a connu un essor exponentiel depuis les dernières années (figure 14), la grande partie de la littérature en douleur s'intéresse toujours aux opioïdes et aux AINS (anti-inflammatoire non stéroïdien) (figure 15). Le manque de nouveauté peut être en partie attribué à la faible valeur prédictive des modèles animaux pour évaluer de nouveaux composés analgésiques ainsi que le nombre limité, de même que la qualité des instruments d'évaluation de la douleur préclinique (Kissin 2010; Campbell et al. 2006). Je considère ainsi que je suis arrivé dans le monde de la douleur à un moment charnière où de nouvelles avenues doivent impérativement être ouvertes pour répondre à la multitude de questions qui surgissent.

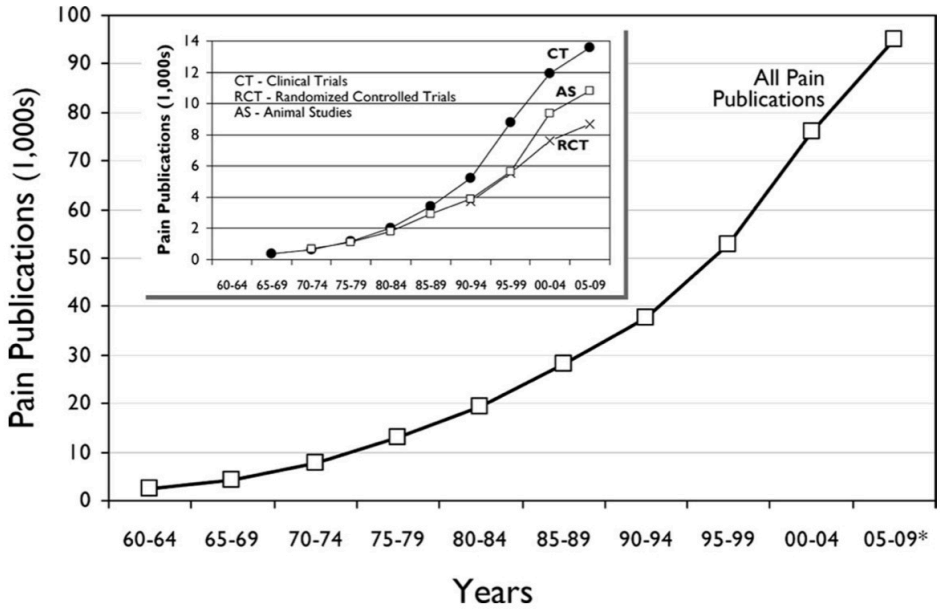



**Figure 14. Croissance du nombre de publications relié à la douleur de 1960 à 2009.**
Toutes les publication ou certains types spécifiques (graphique inséré) sont présenté par tranche de cinq ans de 1960 à 2009 (seulement 4,5 ans pour la dernière tranche). Les études cliniques (CT pour *clinical trials*) inclues toutes les phases possible de ce type d'études. Tiré de (Kissin 2010).

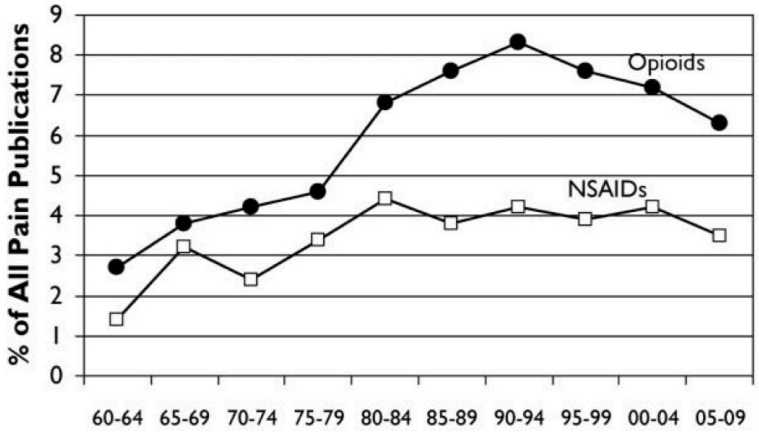



**Figure 15 : Proportion du nombre de publication reliée à la douleur portant sur les opioïdes et les AINS de 1960 à 2009.**
Tiré de (Doré-Savard et al. 2012; Kissin 2010; Doré-Savard et al. 2010; Doré-Savard et al. 2013).

Il y a différentes façons d'aborder la problématique du manque de nouveaux composés analgésiques. Tout d'abord, il possible de penser que la douleur chronique est

simplement une pathologie très complexe et qu'il est normal de piétiner autant pour trouver de nouvelles molécules actives pour traiter ces douleurs rebelles. Il est également possible de se questionner sur la fiabilité clinique des modèles animaux, à savoir, est-ce que les modèles utilisés actuellement reflètent adéquatement la réalité clinique. Un pan de la recherche du laboratoire du Pr Philippe Sarret s'intéresse à cette question en développant et validant un nouveau modèle de douleur cancéreuse (Vierck, Hansson, and Yezierski 2008; Doré-Savard et al. 2012; Lascelles and Flecknell 2010; Doré-Savard et al. 2010; Doré-Savard et al. 2013), mais cette problématique de validité par rapport aux douleurs humaines est également vrai pour tous les modèles animaux de douleur chronique. Une autre question faisant l'objet de nombreux articles sur la douleur est de savoir si les méthodes précliniques d'évaluation de la douleur, sur lesquelles est basée la démonstration de l'efficacité analgésique, sont adéquates et permettent d'évaluer les vraies douleurs rencontrées par les patients dans leurs activités quotidiennes (Berrocoso et al. 2011; Vierck, Hansson, and Yezierski 2008; N. Kumar et al. 2010; Lascelles and Flecknell 2010; LaBuda and Little 2005). La réponse à cette grande problématique n'est pas unique et réside sûrement dans toutes les pistes de réponses proposées précédemment. La douleur est un phénomène d'une grande complexité, c'est pourquoi il est essentiel d'avoir des modèles animaux de qualité en plus d'un appareillage permettant l'évaluation de douleur de type clinique le plus proche de la réalité.

Nous avons ainsi voulu répondre à une autre facette de cette problématique, à savoir si les méthodes d'évaluation préclinique de la douleur étaient adéquates. La plupart des tests actuels sont basés sur un stimulus induit et de ce fait ne permettent pas d'évaluer les douleurs continues, spontanées, induites par le mouvement volontaire ou encore d'autres paramètres de qualité de vie connexes. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la qualité de vie se définit comme suit : « *C'est la perception qu'a un individu de sa place dans l'existence, dans le contexte de la culture et du système de valeurs dans lequels il vit, en relation avec ses objectifs, ses attentes, ses normes et ses inquiétudes. La qualité de vie est donc multidimensionelle puisqu'elle dépend de l'état physique, des sensations somatiques, de l'état psychologique et du statut social. Dans le domaine de la santé, la qualité de vie est une mesure subjective du point de vue des intéressés* ». La condition

physique et les douleurs font ainsi partie intégrante de la qualité de vie. C'est ainsi que dans le questionnaire de qualité de vie de l'OMS, au moins deux questions se rapportent directement à l'impact de la douleur sur la capacité de se déplacer et l'accomplissement des activités quotidiennes. L'amélioration de ce type de paramètre est alors lié à une amélioration d'une partie de ce qui est défini comme la qualité de vie. De plus, il est important de mentionner que la plupart des analgésiques classiques qui sont souvent rapportés comme étant inefficaces par les patients sont fonctionnels dans les tests comportementaux de type réflexif (Olesen et al. 2012; Berrocoso et al. 2011; N. Kumar et al. 2010; LaBuda and Little 2005). Nous avons donc voulu utiliser un appareil de type non réflexif, qui semble plus en accord avec ce qui peut être vécu par les patients dans leurs activités quotidiennes (Olesen et al. 2012). L'aspect biopsychosocial tel que la présence de stress, d'anxiété, de dépression, de mauvaise estime de soi, etc. sont évidemment des paramètres majeurs de l'évaluation de la qualité de vie, mais nécessitent d'autre paradigmes expérimentaux, dont certains seront discuté dans cette thèse, afin d'être évalué de façon adéquate au niveau préclinique.

Le professeur Sarret a instauré, dès le début de mon doctorat, une collaboration avec une compagnie française (BIOSEB) qui venait de développer un nouvel appareillage très prometteur. Cet appareil fait intervenir près de 2000 capteurs de pression disposés de façon à recouvrir une surface de 22 cm x 22 cm. Dans cet environnement, l'animal peut se déplacer librement et différents paramètres peuvent ainsi être enregistrés pendant la période de temps voulu. Tous les détails de cette technique sont expliqués dans le premier article inclus dans ma thèse. Cet article s'inscrit dans un courant important de changement de paradigme expérimental. En effet, de plus en plus de groupes de recherche utilisent des appareillages ou des méthodes permettant d'évaluer la douleur spontanée, c'est-à-dire des comportements douloureux non induits par un stimulus externe (Vrinten and Hamers 2003; K.-S. Lee, Huang, and Yen 2012; Bozkurt et al. 2008; Cobos et al. 2012; Angeby-Möller et al. 2012; King et al. 2009; Gabriel et al. 2009; Koplovitch, Minert, and Devor 2012; Tétreault et al. 2011; He et al. 2012; Tétreault et al. 2013; Doré-Savard et al. 2012; Boyd et al. 2007; Rashid et al. 2012; Navratilova et al. 2013; Sufka 1994; Kawasaki-Yatsugi et al. 2012; Nagakura et al. 2012; Andrews et al. 2011; Andrews et al. 2012; Jirkof et al. 2010; Matsumiya et al. 2012; Sotocinal et al. 2011; Langford et al. 2010; Jourdan, Ardid, and

Eschalier 2002; Wallace, Norbury, and Rice 2012; Wendy O Williams 2008; Wall et al. 1979; G. J. Bennett and Xie 1988; Devor 1991; Blumenkopf and Lipman 1991). Ces nouvelles méthodes permettent ainsi d'évaluer des composantes non sensorielles de la douleur, d'ordre affectives et émotionnelles, plus proches de l'état des patients atteints de douleur chronique. Le tableau suivant résume les différents tests comportementaux de type non réflexif existant actuellement dans la littérature.

**Tableau 5 : Description des différents tests comportementaux non-réflexifs**

Information tiré de (G. J. Bennett 2012; Vrinten and Hamers 2003; Bozkurt et al. 2008; Angeby-Möller et al. 2012; Gabriel et al. 2009; Tétreault et al. 2011; Tétreault et al. 2013; Cobos et al. 2012; Doré-Savard et al. 2012; Boyd et al. 2007; Rashid et al. 2012; Navratilova et al. 2013; Koplovitch, Minert, and Devor 2012; Sufka 1994; King et al. 2009; Kawasaki-Yatsugi et al. 2012; Nagakura et al. 2012; Andrews et al. 2011; Andrews et al. 2012; Jirkof et al. 2010; Matsumiya et al. 2012; Sotocinal et al. 2011; Langford et al. 2010; Jourdan, Ardid, and Eschalier 2002; Wallace, Norbury, and Rice 2012; Wendy O Williams 2008; Wall et al. 1979; G. J. Bennett and Xie 1988; Devor 1991; Blumenkopf and Lipman 1991)

| Nom du test ou de l'appareil | Fonctionnement | Avantages | Inconvénients | Type de douleur chronique testé | Références |
|---|---|---|---|---|---|
| Catwalk | Positionnement des pattes par réfraction de la lumière dans un corridor de marche | Haute résolution de surface, possibilité d'analyse approfondie de la démarche | Faible éclairage et entraînement requis, pression déduite, coût | Neuropathique (CCI, sciatic nerve crush), inflammatoire (carraghénine) | Vrinten *et al.*, 2003. Bozkurt *et al.*, 2008. Angeby-Moller *et al.*, 2008. Gabriel *et al.*, 2009 |
| Dynamic Weight Bearing (DWB) | Distribution pondérale dynamique à l'aide de capteur de pression piézoélectrique | Pas d'acclimatation, acquisition dynamique, pression réelle | Faible résolution de surface, surface de déplacement petite | Inflammatoire (CFA), neuropathique (CCI), cancéreuse osseuse | Tetreault *et al.*, 2011 et 2013, Cobos *et al.*, 2012. Doré-Savard *et al.*, 2012 |
| Tekscan | Distribution pondérale à l'aide de capteur de pression piézoélectrique | Plus grande résolution que le DWB, peu d'acclimatation, pression réelle | Non dynamique, courte période d'analyse | Neuropathique (SCI, sciatic nerve crush), inflammatoire (MIA) | Boyd *et al.*, 2007. Rashid *et al.*, 2012 |
| Operant behavior : condition place preference (CPP) | Comportement inné de l'animal à fuir un environnement aversif ou à aller vers un endroit procurant un soulagement | Appareillage simple et peu couteux | Entraînenement requis, un paramètre évaluable (CPP présent ou pas), facteur confondant avec composés présentant un potentiel d'abus | Neuropathique (SNL, SNI, axotomie), inflammatoire (MIA, CFA) | Navratilova *et al.*, 2013. Koplovitch *et al.*, 2012. Sufka *et al.*, 1994. King *et al.*, 2009 |
| Mouvement spontané avec aimant | Implantation plantaire d'un aimant pour enregistrer les mouvements | Grande précision d'analyse des mouvements spontanés, peut être évalué sur une grande période de temps | Nécessite l'implantation chirurgicale d'un aimant, espace d'acquisition restreint à l'élément magnétique | Neuropathique (CCI) | Kawasaki-Yatsugi *et al.*, 2012. Nagakura *et al.*, 2012 |
| Spontaneous burrowing behaviour | Comportement inné de l'animal à creuser | Appareillage simple et peu couteux | Fiabilité faible si présence d'atteinte motrice | Neuropathique (TNT, SNT, PSNL), inflammatoire (CFA) | Andrews *et al.*, 2011 et 2012. Jirkof *et al.*, 2010 |
| Rat Grimace Scale | Cotation de l'expression faciale des rats comme signe de douleur | Paradigme d'évaluation utilisé pour la première fois dans la littérature | Influence de l'environnement, faible résolution de cotation des comportements | Neuropathique (CCI, SNI) inflammatoire (CFA, Carraghénine, Zymosan) | Matsumiya *et al.*, 2012. Sotocinal *et al.*, 2011. Langford *et al.*, 2010 |
| Comportement de vocalisation | Production d'ultrason correspondant à différentes sensations | Acquisition peut être réalisé dans l'environnement naturel de l'animal | Technique ayant montré des résultats contradictoires, sensible à la pollution sonore | Neuropathique (CCI, diabétique par injection de streptozotocine), inflammatoire (carraghénine, CFA) | Jourdan *et al.*, 2002. Wallace *et al.*, 2012. Williams *et al.*, 2008 |
| Comportement d'autotomie | Comportement de l'animal à pratiquer de l'autotomie après une atteinte nerveuse | Ne nécessite pas d'appareillage particulier | Observable dans des modèles de douleur neuropathique seulement, limite éthique | Neuropathique (axotomie, CCI) | Wall *et al.*, 1979. Bennett et Xie, 1988. Devor *et al.*, 1991. Blumenkopf *et al.*, 1991. Koplovitch *et al.*, 2012 |

CCI (Chronic Constriction Injury), CFA (Complete Freund's Adjuvant), SNL (Spinal Nerve Ligation), SNI (Spared Nerve Injury), MIA (Mono-iodoacetate), SCI (Spinal Cord Injury), TNT (Tibial Nerve Transection), SNT (L5 Spinal Nerve Transection), PSNL (Partial Sciatic Nerve Ligation)

Ces questions m'amènent vers un sujet des plus actuels dans la compréhension des phénomènes sensitifs observés dans les douleurs chroniques, à savoir ce qu'est la douleur spontanée et dans quel contexte elle apparaît. Dans un article récent, le chercheur Gary J. Bennett, de l'université McGill à Montréal, discute du sujet en profondeur (G. J. Bennett 2012). Il part de la prémisse que nous avons une idée fausse de ce qu'est la douleur spontanée et énumère les trois principales raisons de cette erreur. 1) Nous utilisons souvent le terme douleur spontanée pour référer à la fluctuation quotidienne de douleur présente dans les douleurs inflammatoires et neuropathiques, mais ce terme ne peut pas s'appliquer au processus inflammatoire continue, il peut seulement s'appliquer dans un contexte neuropathique. 2) La douleur spontanée peut être évoquée par un stimulus (externe ou interne), qui peut passer inaperçu parce qu'il fait partie des activités quotidiennes normales. 3) En condition inflammatoire ou neuropathique, l'allodynie et l'hyperalgésie présente peuvent causer de nombreux épisodes quotidiens de douleur induite par un stimulus. Il se pourrait alors que ces épisodes douloureux s'additionnent au fil du jour pour produire le niveau changeant de douleur persistante qui est alors confondue avec la douleur spontanée (Carraway and Leeman 1973; G. J. Bennett 2012). Cet article soulève également le problème de la terminologie. En effet, de nombreux articles utilisent des termes pour décrire les paramètres évalués, que ce soit chez l'animal ou l'humain, sans vraiment les définir. Comme le groupe de travail sur la taxonomie de l'IASP ne propose pas de définition de la douleur spontanée, Bennett présente alors les définitions suivantes pour clarifier ces différents termes. **Douleur continue** : douleur due à une décharge inflammatoire continue causée par la présence permanente des produits de la réaction inflammatoire initiale. **Douleur spontanée** : douleur due à une décharge spontanée dans les neurones somatosensoriels qui est causée par des changements qui sont intrinsèques au neurone. **Douleur cumulée** : douleur due à une sommation temporelle d'épisodes de douleurs allodyniques et hyperalgésiques qui sont évoqués par les stimuli de la vie quotidienne (que ce soit en condition inflammatoire ou neuropathique).

***Le système neurotensinergique***

En plus de trouver de nouvelles méthodes d'évaluation de la douleur, nous avons toujours espoir de trouver une façon de mieux traiter les douleurs chroniques avec, dans

certains cas, de nouvelles approches pharmacologiques. La problématique générale de mon projet de doctorat étant définie, j'aborderai maintenant la question des cibles thérapeutiques de notre groupe de recherche. Le laboratoire du Pr Philippe Sarret a été fondé en 2005 avec comme thématique principale l'implication du système neurotensinergique dans la modulation de la douleur. Huit ans plus tard et après environ 40 publications directement issues du laboratoire, plusieurs autres thématiques se sont greffées à l'objet initial. Il n'en demeure pas moins que ce système, à l'origine des recherches du professeur Sarret au milieu des années 90, reste toutefois au centre de ses recherches. C'est en 2008 que j'ai eu le plaisir de me joindre à l'équipe de son laboratoire et de commencer mes recherches sur la neurotensine et ses récepteurs. Je me suis rapidement intéressé à la problématique de la douleur neuropathique, devenue par la suite l'aspect central de mon doctorat. Je détaillerai dans les paragraphes suivants le système neurotensinergique et ses principaux constituants, soit la neurotensine et ses récepteurs.

*La neurotensine*

La neurotensine est évidemment la molécule pivot de ce système. Ce peptide de 13 acides aminés a été découvert en 1973 à l'Université Harvard par Robert Carraway et Susan E. Leeman (Kitabgi et al. 1992; Carraway and Leeman 1973). Le gène de la neurotensine, NTS, code pour deux peptides, soit la neuromedine N (NN) et la neurotensine (NT) (voir figure 16) (Kitabgi et al. 1992). Toutefois, la recherche sur la NN est peu abondante et ce peptide ne semble pas jouer de rôle aussi important que ce qu'il est possible d'observer avec la NT.

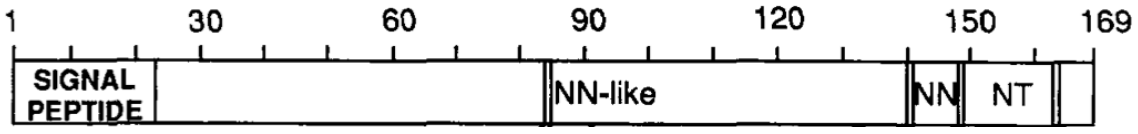



**Figure 16. Représentation graphique du prépropeptide contenant la neurotensine (NT) et la neuromédine N (NN).**
Tiré de (Bissette et al. 1976; Kitabgi et al. 1992).

Initialement isolée d'extrait d'hypothalamus bovin, la NT a été identifiée de prime abord comme un peptide modulateur de tension en raison de son effet hypotenseur chez le rat, induisant une vasodilatation importante. Depuis cette publication étalon, près de 5100 articles ont été publiés sur la neurotensine et son implication a été montrée dans un grand nombre de processus physiologiques, allant de l'hypothermie (Brown and Vale 1976; Bissette et al. 1976), au métabolisme de l'insuline (Frey, Lis, and Coward 1988; Brown and Vale 1976), à des effets modulateurs des systèmes dopaminergique et cholinergique (Clineschmidt and McGuffin 1977; Frey, Lis, and Coward 1988; Dobner 2006), à la modulation de la douleur (Mustain, Rychahou, and Evers 2011; Clineschmidt and McGuffin 1977; Dobner 2006), et d'autres encore. Lire (Boules et al. 2013; Mustain, Rychahou, and Evers 2011) pour une revue détaillée. En résumé, la NT joue un rôle de neurotransmetteur au niveau du système nerveux et un rôle d'hormone au niveau périphérique (principalement gastro-intestinal). Je m'attarderai ici aux fonctions de la NT principalement sur le système nerveux. La NT peut agir en tant que neuromodulateur sur un grand nombre de neurotransmetteurs, incluant les systèmes dopaminergique, sérotoninergique, GABAergique, glutamatergique et cholinergique (Mustain, Rychahou, and Evers 2011; Boules et al. 2013). À cause de ces nombreuses interactions, la NT a été impliquée dans plusieurs pathologies du SNC comme la schizophrénie, l'abus de drogues, la maladie de Parkinson, les troubles alimentaires, certains cancers, la douleur, etc. (Cooper et al. 1981; Mustain, Rychahou, and Evers 2011; Emson et al. 1985; Sarret and Beaudet 2003).

La NT est largement distribuée au niveau cérébral et est directement produite et sécrétée par les neurones. Chez les mammifères comme le singe, le rat, mais aussi chez l'humain, on retrouve les plus fortes concentrations dans l'hypothalamus, la substance noire, la substance grise périaqueducale, le tectum mésencéphalique, le locus coeruleus, l'amygdale, l'hippocampe et le thalamus, pour ne nommer que ces régions (Cooper et al. 1981; Emson et al. 1985; Sarret and Beaudet 2003) (figure 17). Il est important de remarquer que certaines de ces régions font partie soit de la matrice élargie de la douleur (amygdale, locus coeruleus) soit elles sont des zones importantes de contrôle de l'information nociceptive ascendante (thalamus) et descendante (substance grise

périaqueducale). Le rehaussement de concentration de NT dans ces régions spécifiques est en accord avec son rôle important dans la modulation de l'information nociceptive.

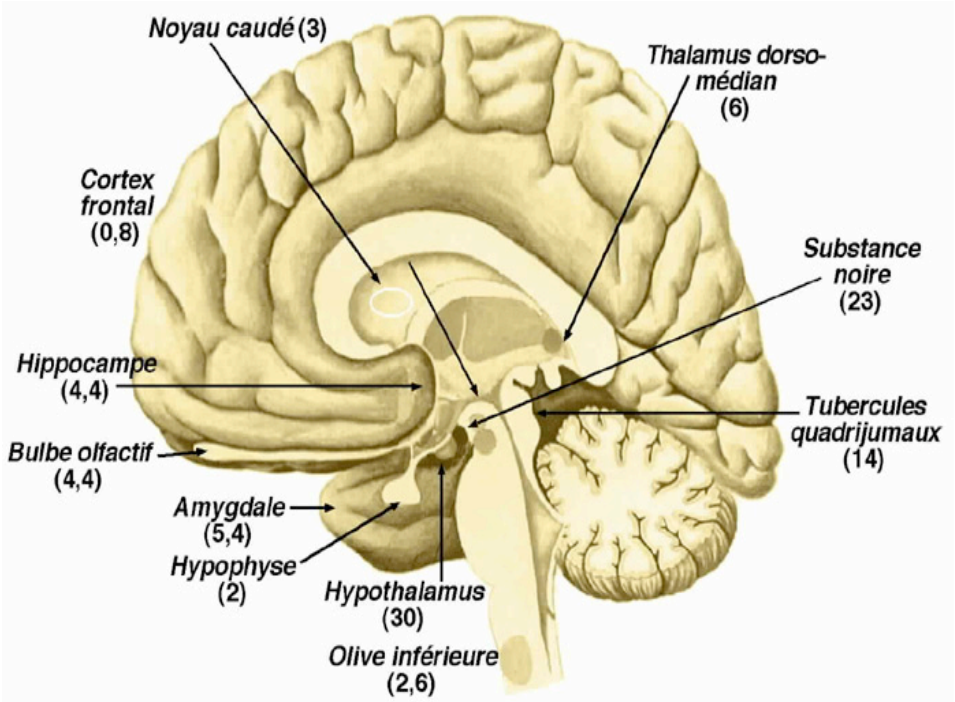



**Figure 17. Représentation schématique des aires du cerveau humain adulte riches en neurotensine.**
Les chiffres entre parenthèses représentent la concentration en NT (pmol/mg de tissus humide). D'après les résultats de (Blumberg, Dayton, and Wolf 1966; Cooper et al. 1981; MARTIN 1967).

Peu de temps après que l'étude initiale ait montré l'effet analgésique de la NT, le même groupe a obtenu un des résultats les plus intéressants de ce système, c'est-à-dire que l'effet analgésique n'est pas renversé par le naloxone ou le naltrexone (qui sont des antagonistes des voies opioidergiques (Clineschmidt, McGuffin, and Bunting 1979; Blumberg, Dayton, and Wolf 1966; Behbehani and Pert 1984; MARTIN 1967; Osbahr et al. 1981; Coquerel et al. 1986; al-Rodhan et al. 1991)) (Basbaum and Fields 1984; Clineschmidt, McGuffin, and Bunting 1979; Sarret and Beaudet 2003; Behbehani and Pert 1984; Osbahr et al. 1981; Coquerel et al. 1986; al-Rodhan et al. 1991). Ce simple résultat est alors devenu la pierre angulaire de l'action analgésique de la neurotensine. Comme

mentionné plus haut dans ma problématique de recherche, la morphine et ses dérivés sont encore aujourd'hui les molécules de référence dans le contrôle de la douleur, et ce malgré leurs effets secondaires importants. La découverte d'une molécule qui n'emprunte pas les mêmes voies pour induire un effet analgésique est ainsi d'un intérêt pharmacologique primordial. Malgré tout, ces deux systèmes importants dans le contrôle ascendant et descendant de la douleur sont connus pour interagir ensemble. En effet, non seulement il a été montré que les terminaisons nerveuses et les fibres antinociceptives descendantes co-expriment les peptides et les récepteurs de ces deux systèmes (Stiller et al. 1997; Basbaum and Fields 1984; Sarret and Beaudet 2003), mais l'injection intra-PAG d'agonistes opioïdergiques induit une relâche de NT (Roussy et al. 2010; Stiller et al. 1997), signifiant une interaction fonctionnelle entre ces systèmes. De plus, l'efficacité analgésique de la morphine est considérablement diminuée chez des souris ayant été invalidées pour le récepteur NTS1 (Nemeroff et al. 1977; Roussy et al. 2010). La possibilité d'utiliser cette interaction fonctionnelle pour obtenir un effet analgésique bonifié sera discutée dans la section discussion de ma thèse.

Toutefois, le problème majeur de la NT, déjà identifiée avant l'étude de Clineschmidt en 1979 (Granier et al. 1982; Nemeroff et al. 1977; Uhl, Bennett, and Snyder 1977), est que les effets analgésiques sont obtenus seulement après une injection au niveau du SNC, signifiant que la NT ne passe pas la barrière hématoencéphalique (BHE). Les études avec la neurotensine et ses dérivés, portant sur le SNC, doivent donc être réalisées à l'aide d'injections intrathécales (i.t.) ou intra-cérébro-ventriculaires (i.c.v.) afin d'obtenir les effets analgésiques escomptés. Différentes approches pour contourner ce problème existent ou sont en cours d'évaluation et seront discutées ultérieurement. Bien que la NT soit un peptide de 13 acides aminés, il est important de mentionner que son activité ne réside que dans un fragment de six acides aminés, en position C-terminale, soit les acides aminés 8 à 13 ayant la séquence suivante : Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu (Vincent, Mazella, and Kitabgi 1999; Granier et al. 1982; Uhl, Bennett, and Snyder 1977). Les différents analogues de la NT ont ainsi été développés au fil des années à partir de ce fragment 8-13 afin, entre autres, d'améliorer leur liaison et leur sélectivité vis-à-vis des sous-types de récepteurs à la NT, leur résistance aux peptidases, et enfin leur capacité à franchir la BHE.

*Les récepteurs à la neurotensine*

Pour induire les effets dont il a été question dans la section précédente, la NT doit agir à travers différents récepteurs. Trois principaux récepteurs de la neurotensine sont connus à ce jour. Les deux premiers ($NTS_1$ et $NTS_2$, figure 18) font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), sous-famille Rhodopsine-like, de type peptidique, tandis que le 3$^e$ ($NTS_3$, figure 19), qui a été identifié initialement comme la protéine intracellulaire de triage sortiline/gp95, est un récepteur à un seul domaine transmembranaire (Tanaka, Masu, and Nakanishi 1990; Vincent, Mazella, and Kitabgi 1999). Le premier récepteur à la neurotensine a été cloné en 1990 par un groupe de Japonais de l'Université de Kyoto (Chalon et al. 1996; Tanaka, Masu, and Nakanishi 1990). Dans cet article, ils ont décrit la procédure d'isolation et ont déterminé la séquence complète d'un clone fonctionnel d'ADNc du récepteur $NTS_1$ de rat, en plus de caractériser les propriétés de ce récepteur et sa distribution tissulaire. Depuis le début des études sur la neurotensine, les résultats suggéraient la présence de plus d'un récepteur ; le deuxième a été cloné en 1996 par le groupe de Daniel Caput en France (Chalon et al. 1996). Dans leur article, ils ont montré que ce deuxième récepteur, chez le rat, partageait 64% d'homologie de séquence avec $NTS_1$ et était capable de lier la NT de façon moindre, mais toutefois comparable, au premier récepteur. Une différence importante était que le nouveau récepteur $NTS_2$ avait la capacité de lier, avec une forte affinité, la lévocabastine, qui est également un antagoniste du récepteur à l'histamine $H_1$ (Vincent, Mazella, and Kitabgi 1999; Chalon et al. 1996).

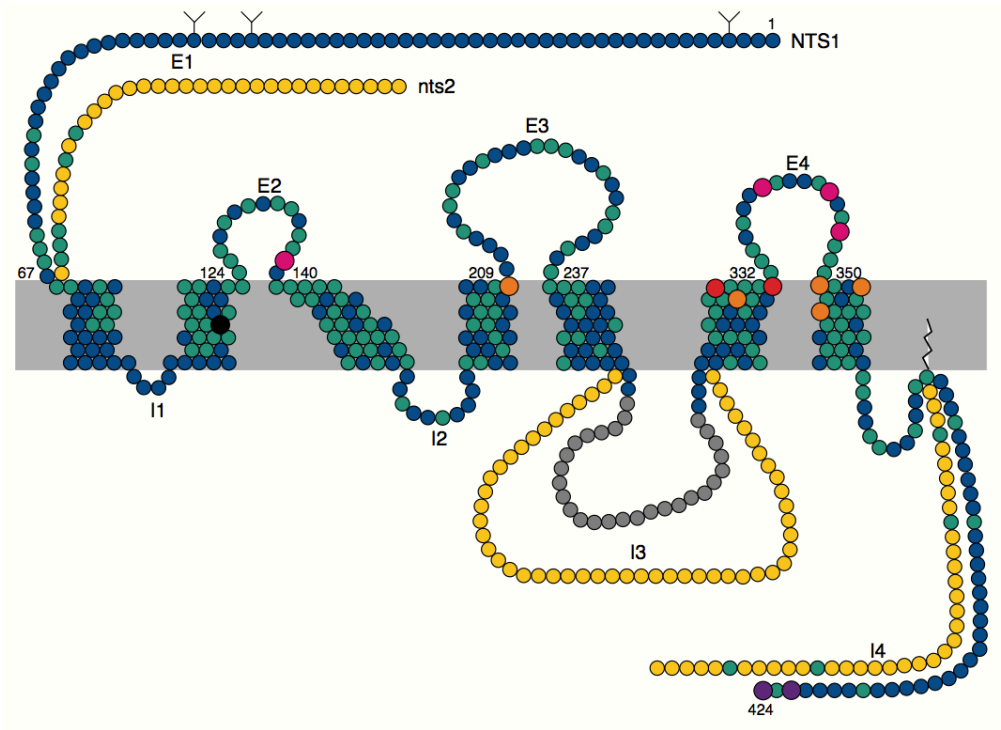



**Figure 18. Les récepteurs à la neurotensine NTS1 et NTS2 de rat.**
NTS1 est montré en bleu et les régions les plus différentes avec NTS2 sont indiquées en jaune. Les résidus impliqués dans la liaison avec la NT sont en rose, ceux liant l'antagoniste sont en orange et ceux liant les deux sont en rouge. Tiré de (Mazella et al. 1998; Vincent, Mazella, and Kitabgi 1999).

Le 3e récepteur a été cloné peu de temps après, en 1998, par une équipe française également, dont faisait partie certains membres de l'équipe ayant mis à jour le récepteur NTS2 ainsi que le directeur de thèse du Pr Sarret. Ce récepteur, NTS3, possédait une homologie parfaite avec la protéine gp95/sortiline et en faisait le premier récepteur de neuropeptide transmembranaire n'appartenant pas à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (Jacobsen et al. 2001; Mazella et al. 1998). L'existence d'un 4e récepteur à la neurotensine a été confirmée il y a environ 12 ans et semble similaire dans sa forme, et potentiellement sa fonction, au récepteur NTS3 (Nielsen et al. 1999; Jacobsen et al. 2001; Navarro et al. 2001; Dobner 2005; Morinville et al. 2004; Mustain, Rychahou, and Evers 2011; Boules et al. 2013; S. Martin et al. 2002). Le rôle précis de ces deux derniers récepteurs n'est pas encore bien déterminé, mais il est suggéré qu'ils pourraient participer au métabolisme de la NT en interagissant avec les deux récepteurs de type RCPG et en jouant un rôle de récepteur charognard afin de dégrader la NT (Richner et al. 2013; Nielsen

et al. 1999; Navarro et al. 2001; Dobner 2005; Morinville et al. 2004; Mustain, Rychahou, and Evers 2011; Boules et al. 2013; S. Martin et al. 2002). Un groupe de recherche du Danemark, collaborant avec le Pr Yves De Koninck de l'Université Laval, a toutefois présenté au dernier congrès du groupe d'intérêt sur la douleur neuropathique, en mai 2013 à Toronto, que la sortiline (NTS3) pouvait jouer un rôle important dans cette pathologie en diminuant de façon indirecte l'expression du co-transporteur de chlore KCC2. Ces résultats intéressants ne sont toutefois pas encore publiés (Sarret, Krzywkowski, et al. 2003; Richner et al. 2013; Motoi et al. 1999). La localisation cérébrale des récepteurs NTS3 et NTS4 suggère également qu'ils peuvent jouer un rôle dans d'autres fonctions de la NT qui ne sont pas liées à son effet analgésique. De plus, leur localisation dans des zones n'exprimant pas de NT, laisse supposer que ces récepteurs pourraient avoir des fonctions non liées au système neurotensinergique (Dobner 2006; Sarret, Krzywkowski, et al. 2003; Mustain, Rychahou, and Evers 2011; Motoi et al. 1999; Boules et al. 2013; Patrycja and Lipkowski 2013).

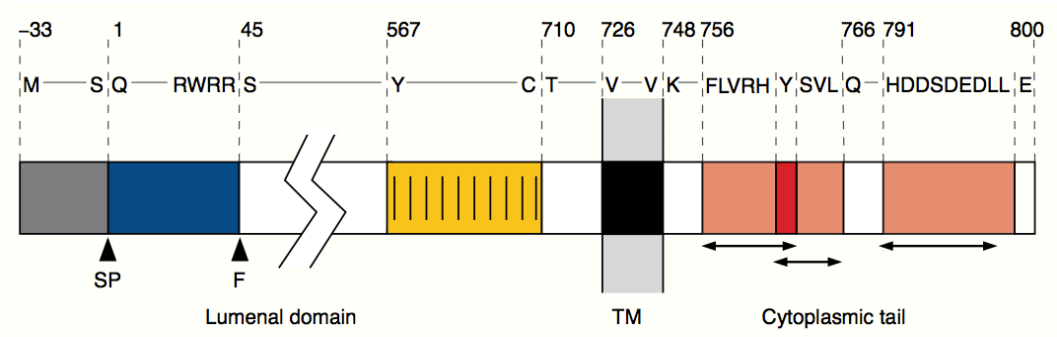



**Figure 19. Récepteur à la neurotensine NTS3 humain.**
Possédant une homologie complète avec la protéine sortiline, ce récepteur possède un seul domaine transmembranaire (en noir), mais différents motifs d'internalisation et de tri (côté C-terminal, souligné par des flèches). Tiré de Vincent, 1999

Les récepteurs NTS1 et NTS2 sont toutefois reconnus comme étant les principaux responsables des effets de modulation de la douleur par la NT (D. J. Smith et al. 1997; Dobner 2006; Mustain, Rychahou, and Evers 2011; Boules et al. 2013; Patrycja and Lipkowski 2013). La recherche portant sur le potentiel analgésique de la neurotensine et ses dérivés a connu un essor considérable depuis les 15-20 dernières années. Différentes publications clés ont montré son rôle dans la modulation des douleurs aiguës et toniques.

L'effet dose-dépendant de la NT au test de retrait de la queue a été montré après injection dans la RVM et la PAG, sans toutefois faire la distinction entre les récepteurs impliqués (Dubuc et al. 1999; D. J. Smith et al. 1997). Le récepteur NTS2 a été initialement identifié comme étant celui responsable de l'effet analgésique de la NT (Pettibone et al. 2002; Dubuc et al. 1999), mais des expériences avec des souris KO a montré que le récepteur NTS1 était également important pour induire cet effet (Sarrieau et al. 1985; Pettibone et al. 2002). Ainsi ce sont principalement ces deux récepteurs qui ont fait l'objet de mes recherches

Tout comme pour le peptide, la localisation des récepteurs à la NT au niveau du système nerveux donne des informations cruciales sur la fonction de ce système. Tel qu'illustré à la figure 20, un grand nombre de régions cérébrales, ici chez l'humain, expriment les récepteurs à la NT. Parmi celles-ci, on retrouve notamment le cortex préfrontal, cingulaire, insulaire, le noyau accumbens, l'amygdale, l'hypothalamus, la substance noire, le locus coeruleus, l'aire ventro-tegmentale, etc. (Asselin et al. 2001; Sarrieau et al. 1985; Sarret et al. 1998; Sarret, Perron, et al. 2003; Sarret and Beaudet 2003). Il est intéressant de remarquer que certaines régions, mais pas toutes, sont similaires à celles où l'on retrouve de la neurotensine. Des études similaires ont été réalisées chez le rat et la souris et il est possible d'observer un certain parallèle avec la localisation de la neurotensine chez l'humain (Sarret and Beaudet 2003; Asselin et al. 2001; Sarret et al. 1998; Sarret, Perron, et al. 2003). En effet, le Pr Sarret a publié en 2003 un impressionnant chapitre de livre qui met à jour la distribution complète des récepteurs à la neurotensine dans le système nerveux central de mammifère adulte et en développement (Z. Li, Boules, and Richelson 2011; Sarret and Beaudet 2003). Un point important à soulever est que les récepteurs, autant que la NT, sont relativement peu présents dans les régions de la matrice de la douleur responsable du traitement de l'information purement sensorielle (cortex somatosensoriel S1 et S2). On retrouve plutôt le système neurotensinergique présent dans les régions cérébrales responsables de l'aspect affectif/émotionnel de la douleur. Il est alors possible de supposer qu'un traitement ciblant ce système aurait plus de chance d'améliorer des paramètres de type motivo-affectif de la douleur plutôt qu'uniquement en moduler l'aspect sensoriel, améliorant ainsi des paramètres identifié comme faisant partie de la

qualité de vie. De plus, la localisation des récepteurs à la neurotensine dans le système limbique, région riche en dopamine et responsable des phénomènes de dépendance et d'abus, pourrait soulever différentes problématiques. Toutefois, des études semblent montrer que cette localisation pourrait au contraire participer à un processus de sevrage alcoolique puisque l'injection systémique de NT bloque la relâche striatal de dopamine normalement induite par la consommation d'alcool (Z. Li, Boules, and Richelson 2011). La NT a aussi été en mesure de diminuer l'auto-administration de méthamphétamine dans un modèle murin (Hanson et al. 2012). Mais les études semblent se contredire puisqu'un autre groupe a montré qu'une micro-injection de NT dans l'aire ventrale tegmentale augmente la décharge des neurones dopaminergiques dirigés vers le noyau accumbens (St-Gelais et al. 2004). Dans l'ensemble, bien que le rôle exact du système neurotensinergique dans le système limbique soit encore sujet à discussion, il est possible de penser que la NT est ses dérivées n'induirait pas ou peu de problème de dépendance et d'abus comme il est possible d'observé avec les opioïdes et les cannabinoïdes.

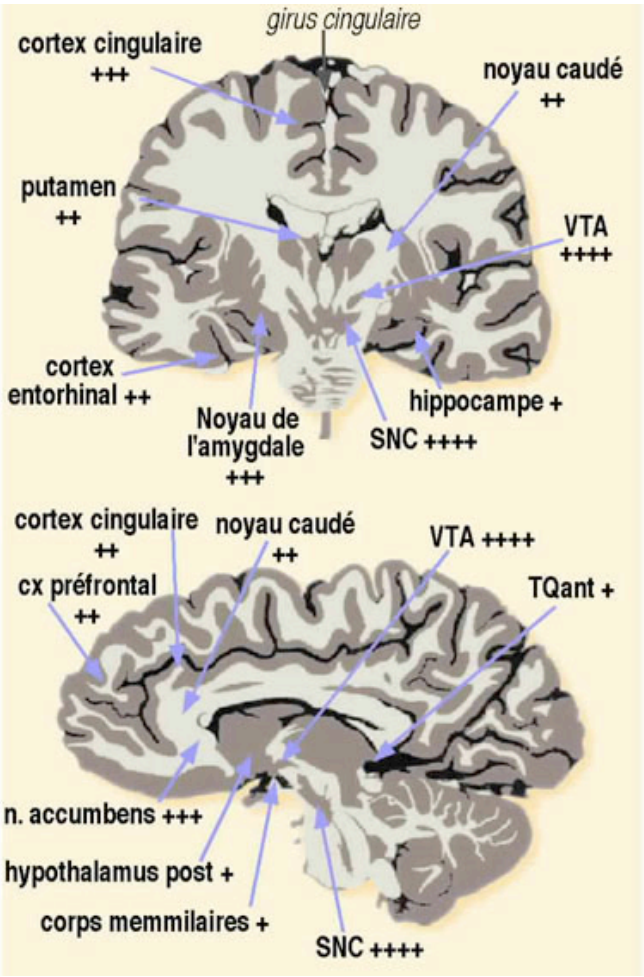



**Figure 20. Distribution régionale des récepteurs à la neurotensine dans le cerveau humain adulte.**
Densité relative des sites de liaison (sur une échelle de 1+ à 4+) de la NT dans les différentes régions cérébrales. SNC : substance noire compacte, TQant : tubercules quadrijumeaux antérieurs, VTA : aire ventro-tegmentale. D'après (Sarret et al. 2005; Sarrieau et al. 1985).

En ce qui a trait à la distribution spinale des récepteurs à la neurotensine, la caractérisation a principalement été réalisée par le Pr Sarret et notre laboratoire. Le récepteur NTS2 est localisé essentiellement au niveau des laminae superficielles I et II de la corne dorsale de la moelle épinière, mais on en retrouve également autours du canal central et des motoneurones de la laminae IX. Les neurones de petits et de larges diamètres présents dans les DRG expriment également le récepteur NTS2, contrairement à ceux de taille moyenne où NTS2 semble être peu présent (Sarret et al. 1998; Sarret et al. 2005). Les

astrocytes sont également connu pour exprimer le récepteur NTS2 (Roussy et al. 2008; Sarret et al. 1998). Par rapport à NTS1, il est possible d'observer une localisation similaire à celle pour NTS2 au niveau de la moelle épinière dans les laminae superficielles I et II. Par contre, on retrouve le récepteur NTS1 surtout dans les neurones petits et moyens des ganglions rachidiens, les neurones larges semblent en être dépourvus (Dubuc et al. 1999; Roussy et al. 2008; Yamauchi et al. 2003; Buhler et al. 2005; Sarret et al. 2005; Roussy et al. 2009; Doré-Savard et al. 2008; Guillemette et al. 2012). De nombreuses publications réalisées entre autres par le Pr Sarret durant ses études doctorales et postdoctorales, par notre groupe de recherche ainsi que par d'autres laboratoires dans le monde, ont montré l'implication spécifique des récepteurs NTS1 et NTS2 dans la douleur (Guillemette et al. 2012; Dubuc et al. 1999; Yamauchi et al. 2003; Buhler et al. 2005; Sarret et al. 2005; Roussy et al. 2008; Roussy et al. 2009; Doré-Savard et al. 2008). Le rôle de ces récepteurs a initialement été démontré chez l'animal dans un contexte de douleur aiguë et tonique ; cette étape de recherche est cruciale avant de procéder à la validation dans des modèles de douleurs chroniques. Récemment, notre équipe a montré que l'activation spinale du récepteur NTS1 diminuait les comportements de nociceptions réflexives observés dans le modèle de CCI de douleur neuropathique (Rivier et al. 1977; Guillemette et al. 2012). Mon deuxième article, en continuité avec ces résultats, expose notre questionnement sur le rôle potentiel du récepteur NTS2 dans la modulation des douleurs neuropathiques. Nous sommes toutefois allés un peu plus loin dans la compréhension du système en évaluant la localisation des récepteurs au niveau neuronal ainsi que l'expression des récepteurs et de la NT dans la moelle épinière et les DRG en rapport à l'évolution temporelle de la douleur.

*Caractérisation de nouvelles molécules neurotensinergiques*

Comme mentionné précédemment, la neurotensine possède des propriétés pharmacologiques des plus intéressantes, mais l'application clinique en tant que molécule analgésique est principalement limitée par sa faible pénétration de la BHE. La chimie médicinale représente le domaine de recherche s'intéressant à l'amélioration des paramètres pharmacologiques d'un composé pour en faire une molécule ayant un meilleur potentiel thérapeutique. C'est pourquoi des modifications chimiques ont été réalisées sur la neurotensine dès les premiers temps de sa découverte afin de modifier ses paramètres

pharmacodynamiques et pharmacocinétiques et d'améliorer son passage de la BHE (Bredeloux et al. 2008; Rivier et al. 1977; G. C. Rossi et al. 2010; Kokko et al. 2005). Depuis, plusieurs groupes ont développé des analogues de la NT possédant des caractéristiques pharmacologiques permettant d'entrevoir la possibilité d'administrer de façon systémique un composé neurotensinergique pour obtenir un effet analgésique central (Lipinski et al. 2001; Bredeloux et al. 2008; G. C. Rossi et al. 2010; Kokko et al. 2005). Dans cette même optique, le laboratoire du Pr Sarret a établi diverses collaborations avec des laboratoires académiques (ex. : Pr Éric Marsault, Université de Sherbrooke et l'équipe de Jean Martinez, Université de Montpellier) ainsi que des laboratoires industriels (ex. : la compagnie Angiochem, basée à Montréal) afin d'améliorer le potentiel thérapeutique de la neurotensine et ses dérivés. Plusieurs des analogues de la neurotensine utilisés au laboratoire (tableau 6) ont été développés par l'équipe de Jean Martinez (les composés JMV) ou celle d'Eliott Richelson (les composés NT).

**Tableau 6. Liste non exhaustive des agonistes neurotensinergiques utilisés au laboratoire avec leur affinité respective pour les récepteurs NTS1 et NTS2.**

| Analogues | Séquences | NTS1 $IC_{50}$ (nM) | NTS2 $IC_{50}$ (nM) | Sélectivité |
|---|---|---|---|---|
| **NT** | pyroGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn- Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH | 0.3 | 3 | 10 |
| **PD149163** | Lys-(psiCH2NH)-Lys-Pro-Trp-Terleu-Leu-OEt | 100 | >10 000 | > 100 |
| **JMV-431** | Boc-Arg-Arg-Pro-Tyr-*psi*($CH_2$NH)Ile-Leu | 3315 | 38 | 88 |
| **JMV2007** | H-Lys-Lys-Pro-Tyr-Ile-TMSAla-OH | 0.02 | 0.026 | - |
| **JMV2009** | H-Lys-Lys-Sip-Tyr-Ile-Leu-OH | 17,5 | 5 | 3 |
| **JMV2004** | H-Lys-Lys-Pro-*psi*($CH_2$-NH)DTrp-Ile-Leu-OH | 2750 | 66 | 40 |
| **JMV2012** | cyclo(Lys-Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu-Lys-Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu) | 150 | 150 | - |
| **NT69L** | [N-ethyl-Arg8,L-Lys9,L-*neo*-Trp11,tert-Leu12]NT(8-13) | 3.1 | 2.1 | 0.7 |
| **NT72** | [D-Lys9,L-*neo*-Trp11,tert-Leu12]NT(9-13) | 34 | 1400 | 35 |
| **NT79** | [N-methyl-Arg8, D-3,1-Nal11,tert-Leu12]NT(8-13) | 2100 | 10 | 210 |

Il est possible de remarquer dans ce tableau que différents types d'agonistes ont été créés afin de cibler de façon préférentielle soit le récepteur NTS1 (PD149163, NT72), le récepteur NTS2 (JMV431, JMV2004, NT79) ou encore les deux récepteurs (JMV2007, JMV2009, JMV2012, NT69L). N'ayant pas la prétention de connaître parfaitement le domaine complexe qu'est la chimie médicinale, je n'en ferai ici qu'un résumé. Une équipe de recherche et développement de la compagnie Pfizer a écrit au milieu des années 1990 un

article décrivant les principaux paramètres à rechercher, nommé « la règle des 5 », pour faire d'un composé un médicament ayant le potentiel d'être pris oralement (Baell et al. 2013; Lipinski et al. 2001). Bien que cette théorie a, depuis, été critiquée, retravaillée et améliorée (Abraham et al. 2010; Baell et al. 2013; Waterhouse 2003), elle reste un fondement important en chimie médicinale : l'article initial a été cité plus de 2000 fois ! Je vais cependant me concentrer sur les spécificités propres aux composés qui ciblent le système nerveux central et qui doivent dans ce cas passer la BHE pour exprimer leurs effets.

Un des paramètres les plus importants est le Log P (aussi appelé coefficient de partition octanol/eau), qui représente le niveau de lipophilicité d'une molécule et ainsi son potentiel de traverser la BHE par diffusion passive (Bredeloux et al. 2008; Abraham et al. 2010; Waterhouse 2003). En diminuant la possibilité d'une molécule à créer des liaisons hydrogènes, on tend vers un Log P positif ce qui augmente ses chances de pénétration au cerveau. Un peptide a par défaut un Log P très négatif et ainsi une capacité presque nulle à traverser la BHE. Comme l'a montré le groupe de Jean Martinez, la cyclisation des peptides est une des méthodes pouvant augmenter le Log P. En effet, le composé cyclique JMV2012 a montré des effets centraux après une injection systémique ce qui laisse supposer un certain passage de la BHE (Zhong et al. 2013; Bredeloux et al. 2008; Shityakov et al. 2013; Pajouhesh and Lenz 2005; Banks 2009). L'aire de surface polaire (ou PSA pour « Polar Surface Area », valeur cible de 60 à 70 $Å^2$) et la masse moléculaire (valeur cible de moins de 450 Da) sont également des facteurs à considérer pour le développement de molécules ayant un potentiel de traverser la BHE (Zhong et al. 2013; Shityakov et al. 2013; Pajouhesh and Lenz 2005; Banks 2009).

Un autre paramètre de premier plan est la résistance des composés face aux différentes peptidases responsables de la dégradation des peptides. La figure 21 illustre les régions de la NT sensible aux peptidase. Parmi les méthodes pour améliorer cette résistance, on retrouve le remplacement d'un acide aminé naturel par un acide aminé non-naturel, et l'ajout d'un groupement protecteur. Ces techniques ont été utilisées pour réaliser le JMV2009, où la proline en position 10 a été remplacée par un substitut non naturel

appelé silaproline (Labbé-Jullié et al. 1994; Vivet, Cavelier, and Martinez 2000; Andersson et al. 2000; Cavelier et al. 2002) et pour le JMV431, où un groupement Boc a été ajouté en position 8 sur le premier acide aminé en position N-terminal (Vivet, Cavelier, and Martinez 2000; Labbé-Jullié et al. 1994; Cavelier et al. 2002; Andersson et al. 2000). Ces modifications diminuent alors la reconnaissance du peptide par les endo- et exopeptidases et augmentent ainsi le temps de demi-vie plasmatique (Gully et al. 1995; Vivet, Cavelier, and Martinez 2000; Akunne et al. 1996; Cavelier et al. 2002; Fan et al. 2008). Les résultats portant sur la caractérisation moléculaire et comportementale du JMV2009 feront l'objet de mon troisième article de doctorat qui est en phase avancée d'écriture. Les résultats principaux seront présentés dans la section discussion sous forme résultats/discussion combiné.

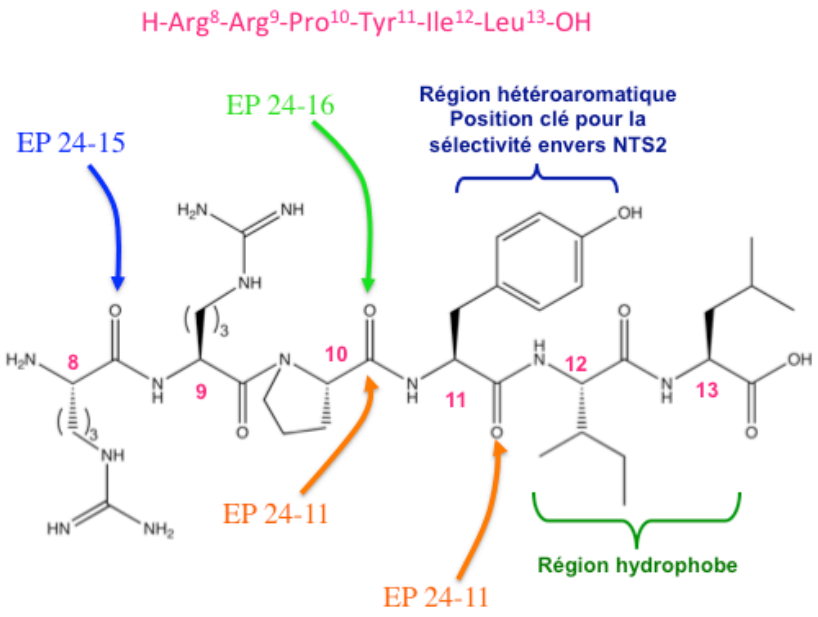



**Figure 21. Séquence peptidique et représentation chimique de la neurotensine.** Les différents sites de clivage par les endopeptidases (EP) sont identifiés par des flèches et certaines régions importantes de la neurotensine sont identifiées par des accolades.

D'autres approches existent afin de faire traverser la BHE à des composés thérapeutiques. L'utilisation de petites molécules reste toujours une des méthodes les plus recherchées grâce à leurs propriétés particulières qui rendent leur formulation en

médicament assez facile. Toutefois, un nombre très limité de petites molécules ciblant les récepteurs à la NT existe actuellement et l'on retrouve principalement des antagonistes (Demeule et al. 2008; Gully et al. 1995; Gabathuler 2012; Akunne et al. 1996; Bertrand et al. 2010; Fan et al. 2008). Dans un projet réalisé actuellement au laboratoire, fait en collaboration avec le Pr Michel Bouvier de l'Université de Montréal, nous utilisons une méthode de criblage à haut débit afin de rechercher des petites molécules pouvant interagir (comme agoniste ou antagoniste) avec le récepteur NTS1.

Une autre approche consiste à utiliser des mécanismes endogènes actifs (récepteurs ou transporteurs) présents au niveau de la BHE afin de faciliter le transport de nouveaux agents pharmacologiques. La compagnie Angiochem a développé un peptide ciblant le récepteur LRP-1, qui est fortement exprimé au niveau de la BHE et qui est responsable d'un phénomène de transcytose (Ché et al. 2010; Demeule et al. 2008; Gabathuler 2012; Bertrand et al. 2010). Après avoir fait la preuve de concept que leur peptide seul avait la capacité de traverser la BHE, Angiochem a commencé à coupler ce peptide avec des molécules chimiothérapeutiques pour cibler différents cancers cérébraux (Pettibone et al. 2002; Ché et al. 2010). Le laboratoire du Pr Philippe Sarret a récemment établi une collaboration avec cette compagnie afin de coupler la neurotensine au peptide qu'ils ont développé dans le but de créer un complexe moléculaire ayant la possibilité d'induire une analgésie puissante après injection systémique. Cette molécule novatrice, appelée ANG2002, a été utilisée avec succès au laboratoire et une publication, dont je suis co-auteur, a été jugée pertinente pour publication dans le *Journal of Clinical Investigation*, mais nécessite des expériences supplémentaires qui sont actuellement en cours.

Comme mentionné précédemment, la chimie médicinale a aussi pour but de moduler les propriétés de liaison d'une molécule pour son ou ses récepteurs. Le récepteur NTS1 est reconnu pour induire une hypothermie importante ainsi qu'une baisse de pression artérielle en plus de son effet analgésique (S. Rajagopal, Rajagopal, and Lefkowitz 2010; Pettibone et al. 2002). La décision d'utiliser des agonistes sélectifs au récepteur NTS2, comme décrit dans mon deuxième article, était alors évidente. Cependant, une théorie récente dépeint une régulation des voies de signalisation intracellulaire des RCPG beaucoup plus complexe que la vision unidirectionnelle classique. Comme illustré à la

figure 22, il est possible d'obtenir un phénomène qu'on appelle signalisation biaisée, c'est-à-dire une activation préférentielle d'une voie de signalisation intracellulaire, tout en minimisant l'activation des autres voies. Si on tient pour acquis que les effets hypothermiques et analgésiques de la neurotensine sur le récepteur $NTS_1$ sont provoquées par des voies de signalisation différentes, il serait alors possible d'obtenir un agoniste liant le récepteur $NTS_1$ ayant des propriétés analgésiques mais n'induisant pas d'effets secondaires. Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire laissent supposer que le JMV2009 posséderait des capacités de ligand biaisé, ce qui en ferait un composé fort prometteur pour induire une analgésie recrutant les deux RCPG de la NT tout en évitant les effets indésirables sur la température corporelle et la pression artérielle.

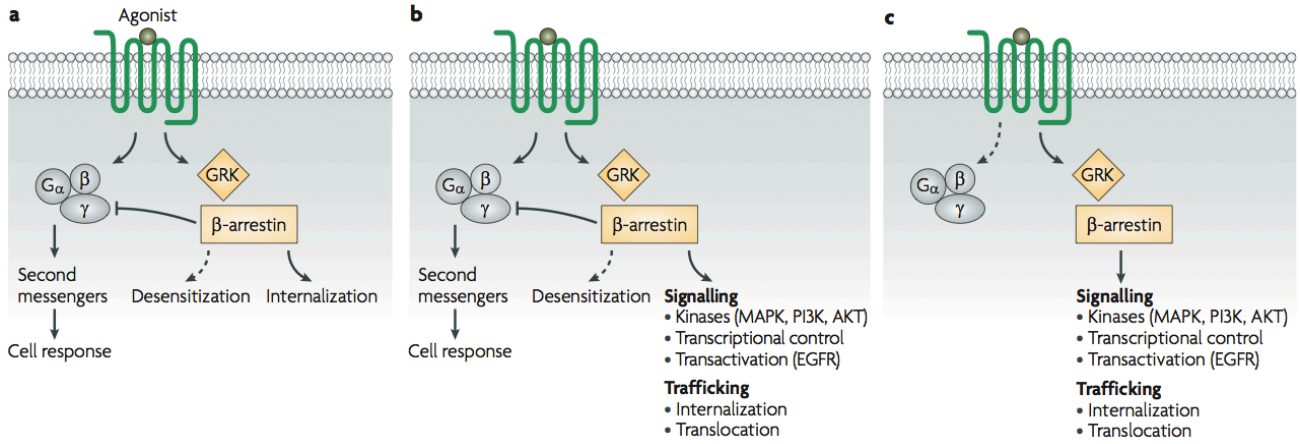



**Figure 22. Signalisation intracellulaire des RCPG par les protéines G ou les β-arrestine.**
A) Dans le modèle classique, une liaison avec un agoniste induit une signalisation par la voie des protéines G et une désensibilisation/internalisation par les β-arrestines. B) Dans le modèle actuel, la liaison d'un ligand peut induire une signalisation par les deux voies de même qu'une désensibilisation/internalisation par les β-arrestines. C) Dans un système en présence d'agoniste biaisé, la liaison de cet agoniste (ici biaisé pour la voie des β-arrestines) n'induit qu'une signalisation via la voie préférentielle, sans activer la voie dépendante des protéines G. Tiré de (Mazella and Vincent 2006; S. Rajagopal, Rajagopal, and Lefkowitz 2010)

Les cellules régulent l'expression de leurs protéines de surface en induisant principalement l'internalisation de celle-ci. Les RCPG, comme les récepteurs $NTS_1$ et $NTS_2$, sont alors internalisés suivant un mécanisme dépendant de la liaison de leur ligand

(Mazella and Vincent 2006). Suivant l'internalisation, un recyclage du récepteur à la membrane peut s'effectuer, mais des études ont montré que le récepteur $NTS_1$, contrairement à $NTS_2$, n'est pas recyclé et est plutôt dirigé vers les lysosomes pour dégradation après son internalisation (Botto et al. 1998; Mazella and Vincent 2006; S. Martin, Vincent, and Mazella 2002). Cette absence de recyclage est probablement due à des différences au niveau de la séquence C-terminale entre les deux récepteurs (Amar et al. 1985; Botto et al. 1998; S. Martin, Vincent, and Mazella 2002). Plusieurs mécanismes d'activations des voies intracellulaires peuvent également s'opérer avant et après le phénomène d'internalisation. Il est connu que le récepteur NTS1 est impliqué dans la mobilisation calcique et la régulation des niveaux intracellulaire de GMPc (Bozou et al. 1989; Amar et al. 1985; Yamada et al. 1993), d'AMPc (Watson et al. 1992; Bozou et al. 1989; Yamada et al. 1993), d'inositol phosphates (Poinot-Chazel et al. 1996; Watson et al. 1992) et des protéines ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases*) (Pelaprat 2006; Poinot-Chazel et al. 1996). Bien que l'activation des protéines G peut varier d'un organisme à l'autre et selon les conditions, certains résultats suggèrent que le récepteur NTS1 lie les protéines $G_{q/11}$ de façon préférentielle (Skrzydelski et al. 2003; Pelaprat 2006), tandis que d'autres montrent que NTS1 peuvent également recruter les protéines $G_s$ et $G_{i/o}$ (Perron et al. 2005; Skrzydelski et al. 2003).

Le récepteur NTS2 se montre cependant beaucoup plus capricieux dans sa fonctionnalité et ses voies de signalisation, ce qui complexifie grandement son étude pour comprendre en détail ses mécanismes. Il a même été montré qu'il existe un variant fonctionnel du récepteur NTS2 possédant seulement cinq domaines transmembranaires (Gendron et al. 2004; Perron et al. 2005; Sarret et al. 2002). Des études ont cependant montré que l'activation du récepteur complet avec la NT et d'autres ligands induit une activation des protéines ERK1/2, qui est dépendante de l'internalisation du récepteur, mais sans entraîner de mobilisation calcique (Mazella et al. 1996; Gendron et al. 2004; Botto et al. 1997; Sarret et al. 2002). Différents résultats suggèrent alors que NTS2 recrute également les protéines $G_{q/11}$ (S. Martin et al. 2002; Mazella et al. 1996; J. F. White et al. 2007; Botto et al. 1997; Hwang et al. 2010), mais d'autres résultats contredisent ces observations et le débat sur quelles protéines G sont recrutées par NTS2 est toujours

ouvert ! Afin de complexifier encore plus les mécanismes des récepteurs à la NT, plusieurs études ont montré que les récepteurs NTS1, NTS2 et même NTS3 sont connus pour former des homo- et des hétérodimères (Hill 2000; S. Martin et al. 2002; Mantyh et al. 1997; J. F. White et al. 2007; Field et al. 2002; Hwang et al. 2010; Rost, Fleischer, and Nieber 2006; Herbert and Holzer 2002). Les mécanismes intracellulaires décrits plus haut sont alors sujets à être modifiés en fonction des dimères présents dans les cellules. À la lumière des nombreuses particularités de signalisation intracellulaire des récepteurs NTS1 et NTS2, plusieurs étapes sont de ce fait requises pour confirmer la présence ou l'absence d'un biais de signalisation par l'agoniste JMV2009.

En résumé, mon doctorat a comporté quatre principaux projets échelonnés sur les cinq ans passés au laboratoire du Pr Sarret. Trois de ces projets ont été présentés dans cette introduction, le 4$^{e}$, portant sur une technique de thérapie génique faisant appel à l'interférence de l'ARN ne sera présenté et discuté que dans la conclusion. Comme illustré dans cette introduction, j'ai eu la chance de contribuer, durant mon doctorat, à la caractérisation d'un nouvel appareil d'analyse préclinique des comportements douloureux plus proche de la réalité clinique, à la démonstration que le récepteur NTS2 représente une cible de choix dans le traitement de la douleur neuropathique et finalement à la caractérisation moléculaire et comportementale d'un nouvel agoniste neurotensinergique démontrant un potentiel analgésique fort intéressant et potentiellement des propriétés d'agoniste biaisé. Je présente dans les pages qui suivent deux de ces projets qui ont fait l'objet de publication.

# Hypothèse et objectifs de recherche

Comme il a été expliqué dans les pages précédentes, le système neurotensinergique possède la capacité de jouer un rôle important dans la modulation des douleurs aiguës jusqu'aux douleurs chroniques. En prenant en considération ces faits, nous émettons l'hypothèse générale suivante :

> L'activation des récepteurs à la neurotensine $NTS_1$ et $NTS_2$ entraînera une diminution significative des différents signes de douleur neuropathique induits par une lésion de type traumatique au nerf sciatique.

Afin de déterminer la validité de cette hypothèse, différents objectifs ont été fixés dans le cadre de mon projet de doctorat :

1. Développer et caractériser une nouvelle méthode d'évaluation des comportements associés à la douleur et à l'inconfort causés par des modèles murins de douleurs chroniques
2. Évaluer si l'activation spinale du récepteur $NTS_2$ à l'aide d'agonistes sélectifs possède la capacité de réduire les signes de douleur neuropathique observés dans différents tests comportementaux
3. Évaluer l'efficacité de méthodes pharmacologiques (agoniste neurotensinergique) et non pharmacologiques (thérapie génique) pour moduler les comportenent douloureux chez le rat suite à l'interaction avec les récepteurs à la neurotensine

# Article 1

## Weight bearing evaluation in inflammatory, neuropathic and cancer chronic pain in freely moving rats

**Auteur de l'article : Pascal Tétreault**[1], Marc-André Dansereau[1], Louis Doré-Savard[1], Nicolas Beaudet[1], and Philippe Sarret[1]

[1] Department of Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada.

**Statut de l'article :** publié dans *Physiology and behavior, 2011 vol. 104 (3) pp. 495-502.*

**Avant-propos :** Dans cet article, j'ai réalisé les expériences et l'analyse portant sur le modèle de douleur neuropathique (environ le 1/3 des expérimentations). J'ai toutefois participé à l'analyse de tous les autres résultats sur les modèles de douleur inflammatoire et cancéreuse. J'ai monté l'ensemble des figures et rédigé la première version de l'article. J'ai ensuite préparé et réalisé la soumission de l'article en ligne. J'ai finalement contribué à la réponse aux évaluateurs pour l'acceptation finale.

**Résumé de l'article traduit en français :**

L'évaluation préclinique de la douleur représente une étape clé dans le développement de nouvelles molécules analgésiques. Le développement récent de différents outils de type non réflexif a permis un essor considérable dans l'évaluation des comportements nociceptifs des animaux de laboratoire. Dans l'espoir de trouver une méthode afin d'évaluer de façon efficace et précise des paramètres de qualité de vie proche de la réalité clinique, nous avons caractérisé un nouvel appareil de distribution pondérale dynamique (DWB pour Dynamic Weight Bearing) dans trois modèles précliniques de douleur chronique. Cet appareil se base sur l'utilisation de capteurs piézo-électriques afin de détecter différentes zones de pression. Des modèles de douleur inflammatoire (CFA), neuropathique (CCI) et cancéreuse osseuse (tumeur fémorale) ont été réalisés chez des rats Sprague Dawley dans le but d'évaluer l'allodynie mécanique à l'aide du test de von Frey et différents paramètres d'inconfort à l'aide du DWB. Nous avons observé des déficits comportementaux montrant une tendance similaire dans les trois modèles, tant pour l'allodynie mécanique (von Frey) que pour la modification de la distribution pondérale. Ces déficits sont détectés au niveau de la patte lésée à partir du jour 3 chez les animaux CCI et CFA et au jour 14 chez les animaux atteints de cancer osseux, signifiant que le DWB représente un outil utile pouvant contribuer à l'évaluation de la douleur. De façon intéressante, nous avons montré que les animaux souffrant de douleur chronique redistribuent majoritairement leur poids sur les pattes avant,

allant de 46 % à 60 % selon le modèle comparativement aux animaux contrôles. Le DWB nous a également permis d'évaluer plusieurs autres comportements d'adaptation liés à la douleur, comme le temps passé sur chacune des pattes et la surface de contact des pattes avec le sol. Nos résultats ont révélé que les animaux CFA, CCI et cancéreux diminuent l'utilisation de leur patte arrière ipsilatérale de 30 %, en plus de diminuer la surface de contact de cette même patte d'environ 50 %. L'ensemble de nos résultats obtenus avec ce nouvel appareil montre qu'il est possible d'améliorer grandement les méthodes d'évaluation préclinique de l'inconfort et de différents paramètres de qualité de vie et pourrait ainsi être d'une grande utilité dans le criblage de futurs analgésiques.

# WEIGHT BEARING EVALUATION IN INFLAMMATORY, NEUROPATHIC AND CANCER CHRONIC PAIN IN FREELY MOVING RATS

**Pascal Tétreault[1], Marc-André Dansereau[1], Louis Doré-Savard[1], Nicolas Beaudet[1], and Philippe Sarret[1,#]**

[1] Department of Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada.

**Running Title: Dynamic weight bearing pain assessment**

Number of text pages: 24
Number of words in Abstract: 252
Number of figures: **5**
Number of tables: **1**

[#] **Corresponding author:**
Philippe Sarret, Ph.D.
Department of Physiology and Biophysics
Faculty of Medicine and Health Sciences,
Université de Sherbrooke
3001, 12e Avenue Nord
Sherbrooke, Quebec, J1H 5N4
Canada

Tel: (819) 820-6868, ext: 12554
Fax: (819) 820-6887
Email: Philippe.Sarret@USherbrooke.ca

**Key words:** Incapacitance, gait, movement-evoked pain, postural deficit, breakthrough pain, pain proxy, Quality-of-Life (QoL).

**Abstract**

Preclinical pain assessment remains a key step for the development of new and potent painkillers. Significant progress in pain evaluation has been achieved with the development of non-reflexive tools. Seeking efficient and clinically relevant devices for pain-related quality of life assessment, we evaluated a new Dynamic Weight Bearing (DWB) device based on pressure captors in three different preclinical chronic pain models. Inflammatory (CFA), neuropathic (CCI) and bone cancer pain (femoral tumor) models were evaluated in Sprague Dawley rats for mechanical allodynia using dynamic von Frey for pain-related behaviors and DWB for discomfort. We observed similar impairment patterns in all of the models for both von Frey (allodynia) and DWB (weight balance) during the complete observation period, starting at day 3 in CCI- and CFA-affected limbs and at day 14 in bone cancer-afflicted rats, indicating that the DWB could be a useful tool for supporting pain assessment. Interestingly, we demonstrated that the main compensation, when animals experienced pain, was seen in the forepaws, ranging from 46% to 69% of increased load compared to normal. Other pain-related coping behaviors were also measured, such as the time spent on each paw and the amount of paw surface contact. Our results revealed that CFA, CCI and cancerous rats decreased the use of their ipsilateral hind paws by 30% and showed a 50% reduction in paw surface pressed against the floor. In conclusion, this new device advances methods of preclinical evaluation of discomfort and quality of life proxies and could be helpful in screenings of putative analgesics.

## INTRODUCTION

Gait and weight bearing evaluation in pain research are often used to monitor impairments inherent to the evolution of a chronic condition[1]. This approach is highly relevant to clinical observations in chronic pain of various etiologies. Indeed, symptomatic knee osteoarthritic patients report that weight bearing activity provokes severe pain[2, 3], and gait pattern alterations were observed by clinicians[4]. In a recent cohort study among patients with cancer-related pain presenting breakthrough episodes, 78% reported amplified pain by activity or weight bearing[5]. Accordingly, in an Italian longitudinal study, 44% of all patients experiencing breakthrough pain (BP) reported episodes of incident pain upon movement, an event related to bone metastasis[6].

Such observations in the last 20 years led to improvements in the comprehension and acceptation of background pain and BP[7-10]. BP refers to episodic pain experience above the usual chronic pain level. Its classification has been refined in terms of spontaneous and incident pain. The first category occurs unexpectedly without any apparent stimulus, and the second is triggered by a stimulus, such as walking[7]. However, BP remains undertreated by clinicians[10]. Recommendations offered by expert task forces need to be further investigated and additional comprehension supported by literature from fundamentalists. Furthermore, in the last fifty years, 59 drugs were introduced as analgesics. Among them, 88% exhibited limited improvement compared to previous drugs, although pain-related publications saw exponential growth, reaching 171,400 articles in the last decade[11]. Morphine and NSAIDS remain at the forefront of biomedical publications. This lack of novelty is partly attributable to the weak predictive value of animal models

used to validate new lead drugs[11] as well as from the limitations of the actual pain assessment instruments. Indeed, it is reported that 80% of centrally acting drug candidates in phase III fail[12], mainly because decisions were based on inappropriate preclinical screening tests. To promote drug development, it is therefore important to provide efficient measurement techniques to facilitate preclinical evaluation of putative analgesics and their potential effects on quality of life.

Thus, different instruments were developed to assess pain-related load and stride variations. Static weight bearing stations (incapacitance meters) for small animals were a step in the right direction, but they were faced with technological limitations for monitoring chronic impairment or incident pain. Min and colleagues thereafter proposed a first generation of "dynamic" weight bearing built with successive load cells placed in a corridor[13]. Hamers' research team initiated a great expansion in this area with an optical technology to analyze dynamic movement of small animals[14]. This last progress in gait/weight bearing assessment stimulated the debate on the scope of conclusions that could be drawn from the data monitored. Some report gait as an objective measure of pain[15, 16], while others present opposing conclusions in a model of neuropathic pain[17].

In line with continuing the development and expansion of those behavioral screening methods to obtain greater validity outcomes in preclinical research, we herein investigate a new dynamic weight bearing device based on pressure sensors and an open recording surface. Three different rat chronic pain models were used to substantiate the method: chronic inflammatory (complete Freund's adjuvant), neuropathic (chronic constriction injury) and cancer (femoral bone cancer) pain models. We propose this

alternative in an effort to reach more robust validation in pain research aiming toward precise, clinically relevant detection of discomfort and incident pain.

## Material and Methods

### Animals

Adult male Sprague Dawley rats (200-225 g; Charles River Laboratories, St-Constant, Quebec, Canada) were maintained on a 14 h light/10 h dark cycle with access to food and water *ad libitum*. Rats were acclimatized 4 days to the animal facility prior to behavioral studies. The experimental procedures in this study were approved by the Animal Care Committee of the University of Sherbrooke and were in accordance with policies and directives of the Canadian Council on Animal Care.

### Pain models

Following baseline measurements, animals underwent a surgical procedure to induce either inflammatory, neuropathic or bone cancer pain. Sham groups were prepared for every type of pain model based on the surgical procedures. Isoflurane (Abbott Laboratories, Montreal, Qc, Canada) was used in each case to induce (5%) and maintain (2.5%) anesthesia during surgical procedures.

### CFA-induced inflammatory pain model

Anesthetized rats received an intraplantar injection of 100 µL of Complete Freund's Adjuvant (CFA) (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) with a 25-gauge needle. CFA was supplemented with desiccated mycobacterium butyricum (Difco laboratories, Detroit, MI, USA) for a final concentration of 8 mg/mL. Saline was added to the mixture to prepare a homogenous 1:1 emulsion.

**CCI neuropathic pain model**

The surgical procedure was performed as previously described by Bennett[18] with a modification in the suture used (5-0 Prolene, Ethicon, inc. Somerville, New Jersey) in order to minimize suture-induced inflammation. Briefly, the left sciatic nerve was loosely ligatured with 4 sutures distant by 1 mm upstream of the tibial, sural and common peroneal nerve trifurcation. The muscle, conjunctive tissue and skin were closed with proper sutures and washed with 3% v/v hydrogen peroxide. Rats were housed for 24 h in separate cages to recover from the surgery.

**Bone cancer pain model**

The surgical procedure was performed accordingly to Doré-Savard et al[19]. Briefly, mammary rat metastasis tumor (MRMT-1) cells (carcinoma) were kindly provided by the Cell Resource Center for Biomedical Research Institute of Development, Aging and Cancer (Tohoku University 4-1, Seiryo, Aoba-ku, Sendai, Japan) and harvested as previously described (Medhurst, 2002). Cells were detached by brief exposure to 0.25% w/v trypsin-EDTA (Gibco, Montreal, Qc, Canada) and prepared for injections. Cells were diluted to achieve a final concentration for injection of 30,000 cells in 20 µl of HBSS and maintained on ice prior to surgery. Rats were laid supine and their right paw was shaved and disinfected with 70% v/v ethanol. A minimal skin incision (8-10 mm) exposed the *quadriceps femoris*. The *vastus lateralis* was incised (5-8 mm in length) to expose the femoral epicondyl while the patellar ligament remained untouched and minimal damage was inflicted to the surrounding muscle and blood vessels. Using a 0.8 A stereotaxic drill (Foredom, Bethel, CT, USA) connected to a 1.75 mm carbide steel burr (Stoelting Co., WoodDale, IL, USA), a small and superficial cavity was burred between the medial

epicondyl and the adductor tubercle (approximately 1 mm in depth). In that cavity, a 25-gauge needle was inserted at a 45° angle, allowing it to reach the intramedullar canal of the femur. The needle was substituted with a blunt end 25-gauge needle connected to a 50 µL Hamilton syringe containing 20 µL of the cell suspension. The syringe was left in place for 1 min to allow cell dispersion in the bone marrow. The needle was then removed and the cavity was sealed with dental amalgam (Prodigy A3, Kerr, Orange, CA) and polymerized with a curing light (QHL75, Dentsply, Milford, DE). The site was thoroughly washed with sterile deionized water. The muscle, the conjunctive tissue and the skin were closed with sutures and washed with 3% v/v hydrogen peroxide. Animals were housed individually for 24 hrs to allow recovery.

**Behavioral studies**

Pain-related behavioral parameters were examined 3, 7, 14, 21 (CFA; n= 6) and 28 (CCI; n= 10) days after CFA injection or nerve surgery and 5, 8, 11, 14, 18 and 21 days after tumor implantation (n=7). Animals were habituated to the examination room at 8 a.m., and tests began one hour later. Dynamic and static weight bearing data were also compared at day 21, corresponding for every animal model to an advanced stage of pain intensity, and at which any stress or acclimatization influence had been controlled for by the previous and repeated testing sequences.

**Allodynia**

Animals were placed in enclosures on an elevated wire mesh floor and mechanical allodynia was assessed using a dynamic plantar aesthesiometer (Ugo Basile, Stoelting, IL, USA). A metal probe (0.5 mm diameter) was directed against the hind paw pad and an upward force was exerted (3.33 g/second). The force required to elicit a withdrawal

response was measured in grams and automatically registered when the paw was withdrawn or the preset cut-off was reached (50 g). Five values were taken alternately on each hind paw at intervals of 15 s. Rats were acclimatized to the enclosures for 2 days prior to testing.

**Dynamic weight bearing assessment**

The dynamic weight bearing (DWB) device (Bioseb, Boulogne, France) consisted of a Plexiglas enclosure (22 × 22 × 30 cm) with a floor sensor composed of 44 x 44 captors (10.89 $mm^2$ per captor). A camera was appointed to the side of the enclosure. The rat was allowed to move freely within the apparatus for 5 min while the pressure data and live recording were transmitted to a laptop computer via a USB interface. Raw pressure and visual data were colligated with the DWB software v1.3. A zone was considered valid when the following parameters were detected: ≥ 4 g on one captor with a minimum of 2 adjacent captors recording ≥ 1 g. For each time segment where the weight distribution was stable for more than 0.5 sec, zones that met the minimal criteria were then validated and assigned as either right or left hind paw or front paw by an observer according to the video and the scaled map of activated captors. Other detected zones (tail, testicles, etc.) were also validated and analyzed. Finally, a mean value for the weight on every limb was calculated for the whole testing period based on the length of time of each validated segment. The time corresponding to weight bore on each paw was also available in the final analysis, lending the possibility to assess the frequency of standing behaviors, such as rearing, exploring and grooming. Animals were not acclimatized to the enclosure before the initial testing period in order to maximize exploration behaviors.

**Static weight bearing assessment**

Static weight bearing was measured using the incapacitance meter (IITC Life Science, Woodland Hills, CA, USA). The animal was positioned in such a way as to set its hind limbs individually on load cells (also known as force plates). The recorded data represented the average weight bore on each cell over a 3 s period that was manually initiated when the animal stabilized its positioning. The measurement was repeated 3 times and the results were averaged for each rat. Acclimatization to the apparatus occurred for two consecutive days before measurements were performed.

**Statistical analysis**

Data are plotted as means ± standard errors of the mean (SEM) for all of the curves and bar graphs. Two-way ANOVA, followed by Bonferroni's *post hoc* t-test, was performed for all graphs, except for the area under the curve (AUC) of front paw (Fig. 4, T-test with Welch's correction). Prism 5 software (GraphPad software Inc, San Diego, Ca USA) was used for all statistical calculations and analyses. A significant difference between groups is represented by the *P* Value; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$.

## Results

*Allodynia onset and dynamic weight bearing evaluation*

Immediately prior to DWB monitoring, allodynia was measured using the reflexive von Frey (VF) test in each model studied (Fig. 1). In the inflammatory model, the ipsilateral paw withdrawal threshold (PWT) was significantly reduced by 40 ± 3% (compared to sham ipsi) 3 days after the injection of CFA. The sensitivity increased until reaching its maximum level at day 21, corresponding to a drop of 75 ± 2% in the PWT (Fig. 1A, $p < 0.001$). Accordingly, the percentage of the animal weight bore on the inflamed paw decreased by 33 ± 7% from day 3 (Fig. 1B). An additional drop of approximately 30% was observed on the last day for the ipsilateral paw. Following chronic constriction injury (CCI), sensitivity to von Frey hair stimulation was first observed on day 3, and the withdrawal thresholds reached a maximum decline of 71 ± 2% at day 21 (Fig. 1C, $p < 0.001$). Reduced use of the injured paw was also detected early in DWB with a mean decrease of 55 ± 3% of weight bore on the ipsilateral paw from day 3 to 28 (Fig. 1D, $p < 0.001$). Similarities between hind paw temporal profiles in VF and DWB were maintained for the entire 28-day observation period. In carcinoma-induced bone pain, mechanical allodynia appeared on day 14 (Fig. 1E) and significantly progressed to day 21, compared to sham animals. DWB revealed a drastic drop of 50 ± 10% in the weight bore on the ipsilateral paw from day 14 (Fig. 1F, $p < 0.001$), which was maintained until the final day of observation.

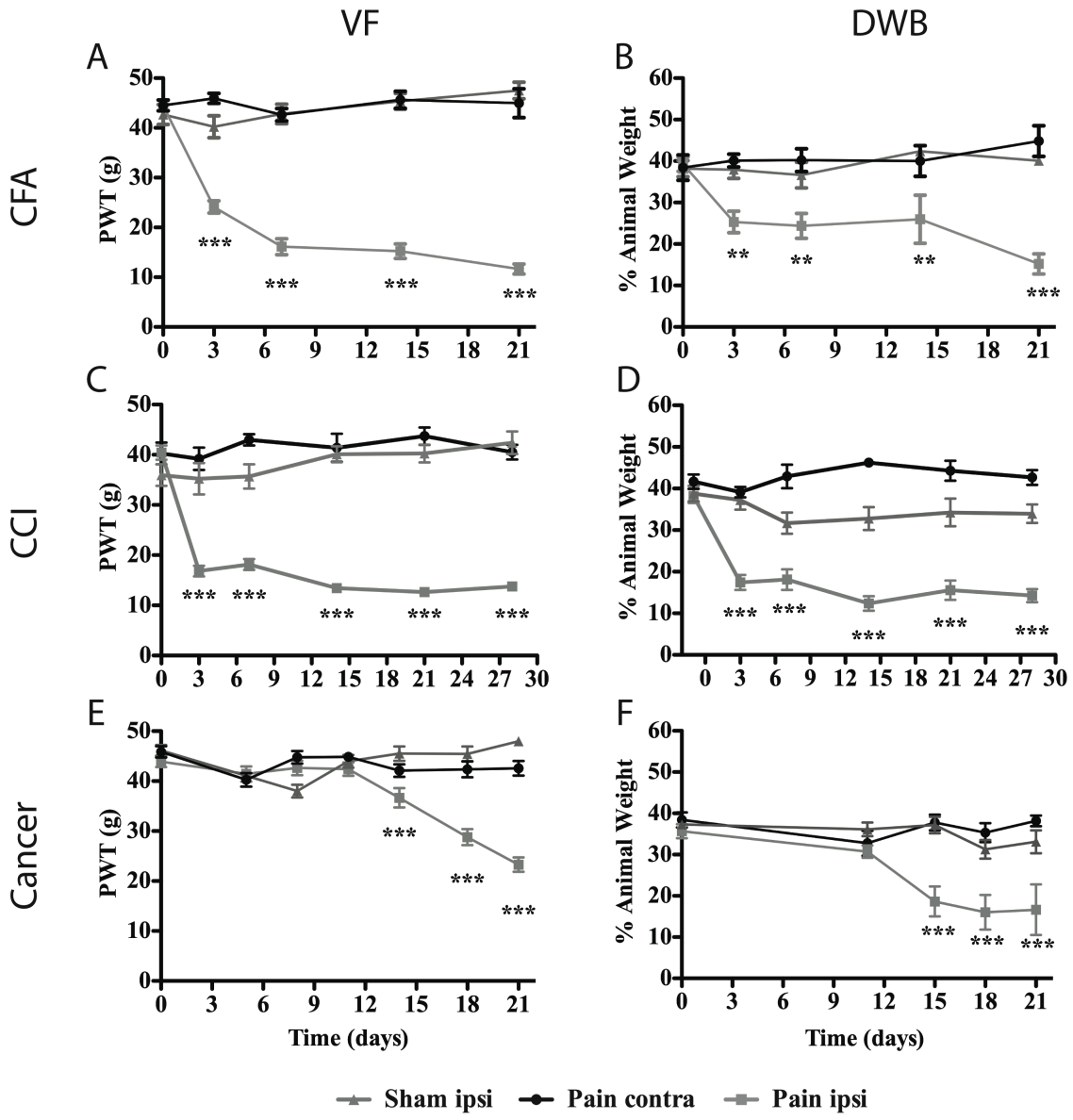



**Figure 1: Pain onset comparison of mechanical allodynia and weight bearing.** The paw withdrawal threshold (PWT) following automated von Frey (VF) hair stimulation and the percentage of animal weight distributed on both ipsilateral (ipsi) and contralateral (contra) hind paws during a 5 min observation period on the DWB were measured at various time points following induction of inflammatory (**A**, **B**), neuropathic (**C**, **D**) and bone cancer (**E**, **F**) chronic pain models, compared to sham animals. Day 0 represents the pre-surgical baseline data. ** P<0.01; *** P<0.001.

*Compensatory shifts in weight bearing*

Data were further compared at day 21, at which pain onset and weight bearing are consistent in the three models under evaluation. For every type of chronic pain (inflammatory, neuropathic and bone cancer), a shift was represented by reductions of 53%, 57% and 50%, respectively, in the ipsilateral paw load in comparison to sham animals (Fig. 2A, $p \leq 0.05$). Interestingly, the load was not redistributed at all to the contralateral paw on day 21 (Fig. 2B). When determining the area under the curve for the whole monitoring period, a similar profile was maintained for the three chronic pain conditions. A global decrease of 43%, 53% and 43% (CFA, CCI and cancer, respectively) in the load bore on the ipsilateral paw was shifted in comparison to sham animals (Fig. 2C, $p < 0.001$). Note that for the whole observation period, there was a slight compensation on the contralateral paw only in the CCI model, while cancer and inflamed animals had no contralateral compensation (Fig. 2D, $p < 0.05$).

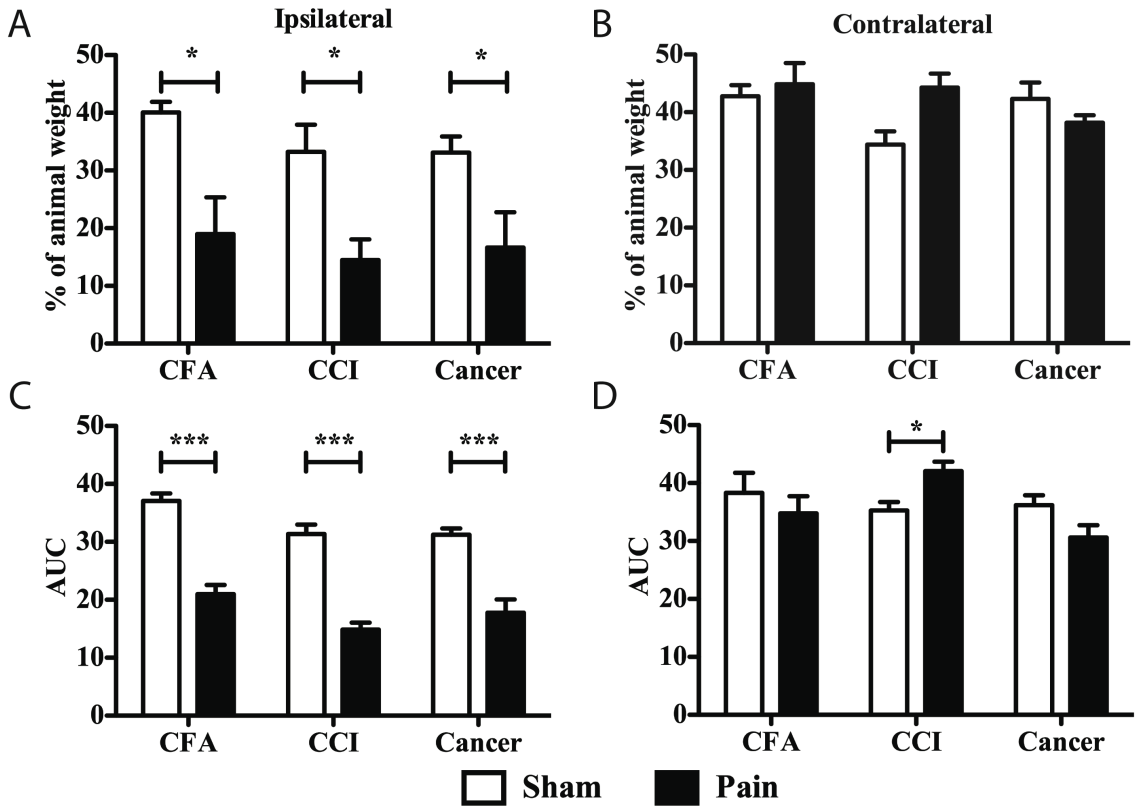



**Figure 2: Weight bearing impairment.** The percentages of the total animal weight resting on the ipsilateral (**A**) and contralateral (**B**) hind paws were assessed with the DWB 21 days after either CFA administration, CCI of the sciatic nerve or bone cancer induction. Area under the curve (AUC) was evaluated in each model for either ipsi (**C**) or contra (**D**) paw for the whole tested period. * P<0.05; *** P<0.001.

We then compared the data obtained using the DWB device with those monitored on the incapacitance meter (SWB). As demonstrated with the DWB, a very similar pattern was detected at day 21 for the ipsilateral paw (Fig. 3A, $p < 0.001$). However, the contralateral paw profiles were drastically different from those of the DWB. For example, in the CCI model, the contralateral load increased by up to 20% of total body weight, representative of the load lost on the ipsilateral paw (Fig. 3B, $p < 0.001$). As opposed to the DWB device (Fig. 2D), this compensation on the contralateral paw persisted for every

model over the whole observation period (Fig. 3C, $p < 0.05$ to 0.001). This can lead to a bias for a further drug screening. Indeed, if we take the cancer pain model for example, the most reported representation in the literature is the ipsi/contra ratio. Under this mean of analysis, a difference of 75% between sham and CCI animal hind paws' load was revealed ($p < 0.01$), while the DWB did not show any significant load modification between hind paws (Fig. 3D).

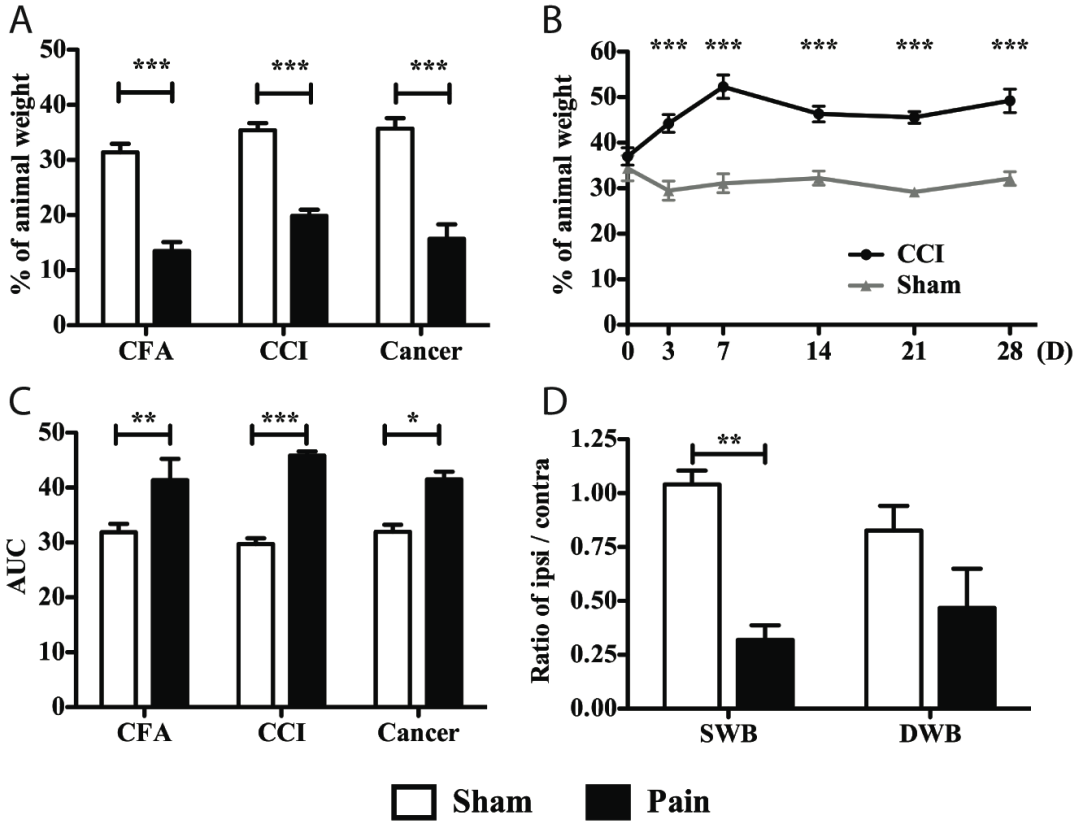



**Figure 3: Biased compensation on contralateral paw with static weight bearing.** (**A**) Percentage of total animal weight on ipsilateral hind paw as observed with static weight bearing (SWB), 21 days after the induction of pain. (**B**) Representative curve of contralateral compensation observed with SWB in the neuropathic pain model. (**C**) Area under curve (AUC) of SWB contralateral curves for inflammatory, neuropathic and cancer chronic pain. (**D**) Comparison of the ratio of ipsilateral over contralateral paw when observed with DWB instead of SWB in the bone cancer pain model. (D) = day, where day 0 represents the pre-surgical baseline data. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

As quadrupeds, rats exhibit natural variations in forelimb use during ambulatory behaviors. The DWB allows precise monitoring of these limbs. The front load of CCI rats was increased by 10% from day 3 compared to sham animals, reaching up to 35% of total body weight at day 21 (Fig. 4A, $p < 0.001$). This is in accordance with a large proportion of the weight displaced from the affected hind paw for the corresponding days (Fig. 1D). Over the whole period of observation, CFA, CCI and cancerous animals showed a similar transfer of their rear load towards forelimbs (69%, 59% and 46% of increase of their usual front load, respectively) (Fig. 4B, $p < 0.001$ and $p < 0.05$). We also monitored the weight pattern for other zones (e.g.: tail and testicles) but found no significant modification (data not shown).

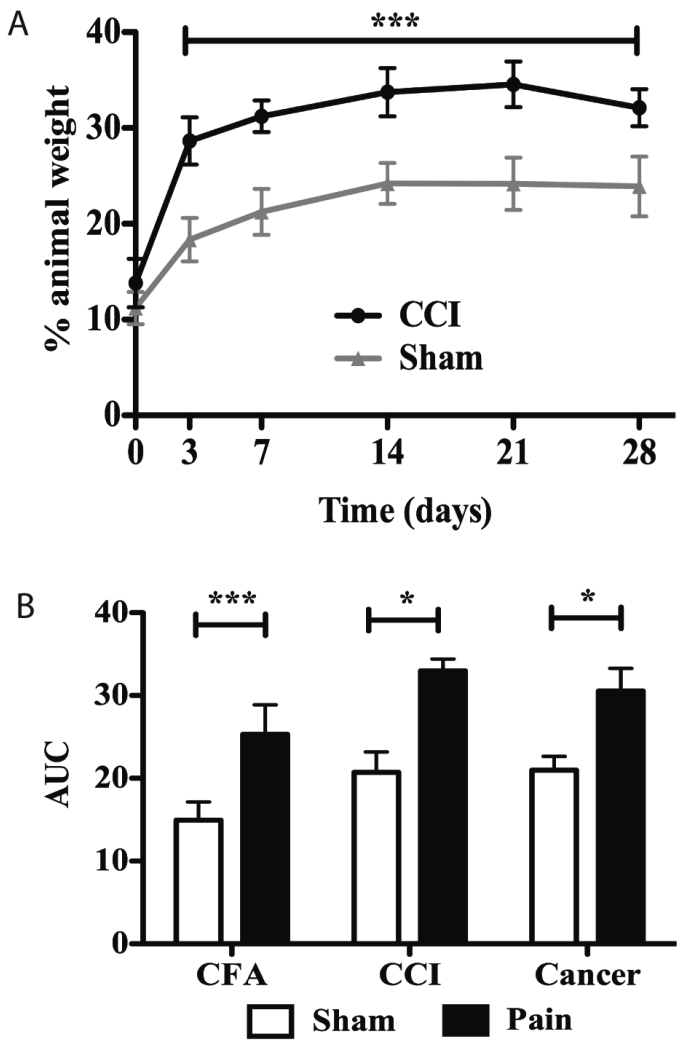



**Figure 4: Forepaw weight redistribution caused by different types of chronic pain.** A representative compensation curve observed for the front paws in the neuropathic pain model (**A**) demonstrates a significant increase of weight bore on front paws. We also monitored the forepaw weight redistribution in all three models used over the whole period of observation (**B**). Day 0 represents the pre-surgical baseline data. * P<0.05; *** P<0.001.

*DWB assessment of paw usage*

Using the DWB, we analyzed the paw surface resting against the floor (Table 1) and the percentage of time that each hind paw was used (Fig. 5). At day 21, the paw plantar surface pressed against the floor was decreased by 49%, 58% and 54% in CFA, CCI, and

cancer models, respectively, when compared to sham animals of identical weight and age (Table 1, $p < 0.001$). According to the weight load on the contralateral hind limb (Fig. 2B), there was no modification in contralateral paw surface (Table 1). Consistent with the fact that the animals bear less weight and decrease the surface of paw pressed against the floor, they also decreased the use of their affected limb for exploring. For example, over repeated time segments of DWB analysis, CCI rats decreased the use of their ipsilateral paw to 33% (day 14; $p < 0.001$, Fig. 5A). When evaluating the area under the curve corresponding to the whole observation period, CCI rats decreased the use of their ipsilateral hind paw by 27% (Fig. 5B, $p < 0.05$), CFA animals by 28% (Fig. 5C, $p<0.01$) and cancerous rats by 29% (Fig. 5D, $p < 0.01$). Interestingly, development of chronic pain tended to decrease the time spent in rearing and grooming behaviors (data not shown).

**Table 1: Comparison of hind paw surface.** The ipsilateral and contralateral paw surfaces resting on the floor ($mm^2$) of sham and pain model animals at day 21 were analyzed with the DWB for all three models. *** $P<0.001$.

| Pain model | ipsi surface ($mm^2$) | | contra surface ($mm^2$) | |
|---|---|---|---|---|
| | sham | pain | sham | pain |
| CFA | 99 ± 4 | 51 ± 21 (***) | 92 ± 7 | 110 ± 20 |
| CCI | 93 ± 9 | 39 ± 10 (***) | 97 ± 10 | 113 ± 9 |
| Cancer | 83 ± 6 | 38 ± 16 (***) | 114 ± 8 | 100 ± 4 |

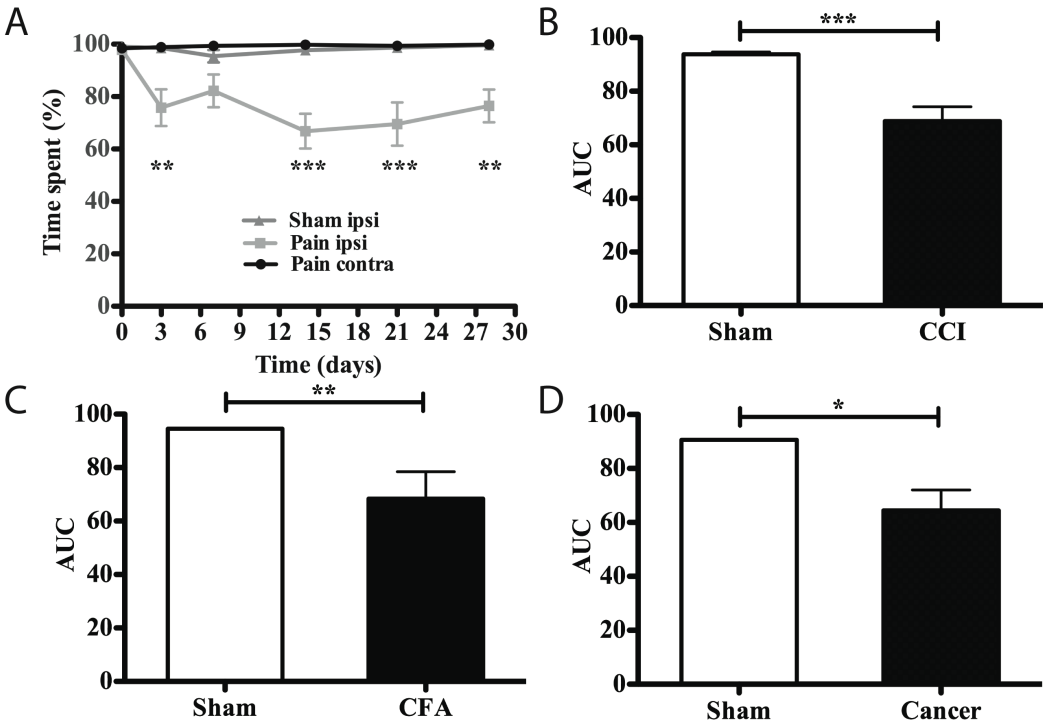



**Figure 5: Percentage of time spent on hind paws.** A representative curve of time spent on rear paws in neuropathic pain model (**A**). Areas under the curves of sham and injured paw utilization time show significant decreases in time spent on the injured paw in CCI (**B**), CFA (**C**) and cancer (**D**) models. Day 0 represents the pre-surgical baseline data. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001.

**Discussion**

The comprehension made of breakthrough pain (BP) and, accordingly, the improvement of behavioral screening devices are meant to lead to improvements in the clinical management of chronic pain. BP monitoring in rodents, however, remains complex, as does the concept of "quality of life" (QoL). In the effort to monitor the movement-evoked dimension of incident pain and proxies to QoL, technologies looking at weight bearing emerged. This drove us to evaluate the DWB device in three rodent pain models to determine its potential use for monitoring discomfort and incident pain evaluation.

It has been proposed that assessment of single dose analgesics on neuropathic patients at rest can be misleading regarding the occurrence of BP during activity, and that, consequently, preclinical research should look into active monitoring of pain episodes[20]. This recently led to the development of a device based on piezoelectric sensors for monitoring subtle load changes where the amount of charge produced is proportional to the applied force on one sensor. Therefore, the rodent freely moves inside an enclosure, on a floor comprised of an interlaced matrix of sensors covering a minimal surface of 10.89 $mm^2$, while the weight bearing data is dynamically acquired.

In our study evaluating this DWB device, allodynia was the reference endpoint for every animal, since it was known to develop consistently for all chronic models tested. Accordingly, weight bearing alteration concurred with allodynia onset and development. This is in line with reports on gait or weight bearing in parallel to allodynia monitoring for

longer than 21 days in neuropathic[16, 17], cancer [19, 21] and inflammatory pain models [22, 23]. However, our aim was not to assess the accuracy of DWB to indirectly detect allodynia, as others performed, but rather to evaluate its capacity to reveal a defection in global postural behaviors as a consequence of chronic pain.

Across the literature, weight bearing is reported either as an ipsi- versus contralateral ratio [24] or a measure of weight difference between both hind paws [21, 22]. Consequently, when evaluating pain with the SWB, the decreasing values of the numerator (ipsilateral weight) are automatically reported to the denominator (contralateral weight), resulting in large ipsi/contra ratios. This is also true when calculating the difference in weight between both hind paws; the moment the ipsilateral paw cannot bear the load, the contralateral paw receives the excess and the resulting difference is twice the reality. For example, a 5 g of weight transferred to the other hind paw will correspond to a 10 g difference (-5 ipsi, +5 contra). Considering that the SWB evaluates the efficacy of an analgesic drug by its efficiency in balancing the load between both hind paws, even a weak and partial analgesia will result in an overestimated effect of the drug[25]. Seldom do the results reported as a percentage over body weight represent the true variability in weight and the impact of a drug [13, 23]. Therefore, our data have been represented as percentages for every standpoint reported on total body weight, and corrections were made for weight increases related to growth for both DWB and SWB. The DWB revealed an absence of compensatory weight shift on the contralateral paw, either at 21 days or throughout the whole testing schedule (AUC), with the exception of the neuropathic pain model. Two things arise from those observations: 1) previous incapacitance measures yielded biased compensatory results due to a technology limitation on hind paw readouts, and 2) a

neuropathic animal behaves differently from cancer- or inflammatory-coping animals, in terms of weight balance. Indeed, CCI animals do present similar allodynia pain profiles to CFA animals, but their postural profile is different. This could be in part due to the retroflexion of the paw occurring in the CCI models, a motor dysfunction that might reflect in a partial contralateral compensation to help in the repositioning of the hips for moving around in the enclosure. In perspective, static weight bearing measures with the SWB device have shown morphine efficacy for balancing the ipsi/contra load ratio [26]. However, patients coping with chronic pain, and therefore with incident pain, are often on opioid treatment but consider their condition undermanaged[5] and complain of poor QoL.

Our data on the DWB also indicate the importance of performing weight bearing evaluations of quadrupeds on their four standpoints. Indeed, the main postural impact of an ipsilateral hind paw injury consists in the compensation occurring along the anteroposterior axis, instead of the mediolateral axis. This forepaw shift was significant in the three models we tested, even in the neuropathic model despite the presence of a weak but significant contralateral shift. Interestingly, Coulthard and colleagues also observed an increase in spatial contact area measures for forepaws, using the Catwalk in an inflammatory model[27]. Thus, under a pathologic chronic condition, the rat load pattern is mostly affecting the forepaws. These postural changes could be the result of a discomfort in performing their habitual grooming and exploratory behaviors, which both frequently imply an upward position of front paws. These latter behaviors are particularly frequent in healthy animals and could be considered as a proxy for QoL. Although the DWB is not composed of infrared beams to account for the animal's ambulation and number of flexes, it can however indicate how much time hind- and fore-paws were in contact with the floor.

Accordingly, the time-of-use of an injured limb should decrease proportionally with the aggravation of the chronic condition. We observed that animals, in the three chronic pain models, bore less weight but also spent less time using their injured paw. The indirect measure of the occurrence of rearing or grooming, determined by the difference of detection time of hind and forepaws, was also less frequent in pathologic animals (data not shown). Data were collected during five minutes of monitoring, allowing us to account for spontaneous behaviors which can be interpreted as QoL proxies. Hence, an efficient analgesic therapy should reflect in a return to baseline weight distribution on all standpoints, in QoL proxies' improvement, as well as in signs of pain alleviation determined by other modalities.

Overall, the DWB presents advantages over the SWB for drug screening. A first key aspect is the evaluation on four standpoints. Rats are quadrupeds and the posture they are forced to adopt during SWB monitoring is not natural to them. The DWB circumvents this limitation, the rodent moving freely to take a natural position thus increasing the accuracy of weight bearing evaluation. Another important aspect is the prolonged monitoring time. Long-term observation should be prioritized in pain research[17] via active sessions [20]. This increases the opportunities to trigger an incident pain episode during drug screening and observe QoL proxies, which are far beyond the 10-second standard monitoring time in SWB. Finally, the absence of experimenter/animal interaction and restraint are strong assets for the DWB. Restraint is a stressful procedure that can modify behaviors and potentially lead to stress-induced analgesia or hyperalgesia for short-term evaluations[28, 29]. The presence of an experimenter can also affect endpoints [30]; video caption monitoring is thus advantageous. However, acclimatization of the animal to

the experimental setup remains important to limit stress-induced analgesia on the day of the testing. In the case of the SWB, animals unacclimatized and unrestrained would have been impossible to test. In opposition, we found here that acclimatization to the DWB enclosure was unnecessary. Indeed, once allodynia was developed in the chronic models, the DWB evaluations showed similar and consistent profiles to those of pain. Also, since the animals were being repeatedly tested over time, we considered them as acclimatized for the late time points (days 18 and 21). If the DWB enclosure itself had caused any kind of stress/distraction-induced analgesia, weight profiles would have remained unaffected in the early monitoring days (days 0, 3 , 7, 11), which was not the case. To further support the validity of our evaluations, we chose to make additional comparisons between the SWB and the DWB at day 21. At that stage, animals in the cancer group had been tested four times, thus considered acclimatized to the DWB in previous evaluations, limiting the possibility of stress-induced analgesia. Day 21 corresponds in every chronic pain model to an advanced stage of pain, thus the DWB and SWB were compared on similar grounds.

It is noteworthy to acknowledge that DWB does not provide information on gait and stride. Automated gait systems built upon optical technologies have allowed intuitive gait analysis[14, 27, 31] and kinematic data monitoring. For instance, the Catwalk has revolutionized the study of those parameters in the small animal in the last decade in situations where high velocity walking is the endpoint under investigation [14]. However, certain drawbacks need to be considered. For example, the measure of weight bearing is indirect[32], using arbitrary units determined by light diffusion. Training sessions or food deprivation/reward sessions are also necessary to stimulate the animal to walk through a corridor to acquire gait data. Light intensity in the room needs to be dimmed to increase

the contrast of the area of contact on the glass surface, forcing reflexive pain tests to be performed under similar lighting conditions to allow the comparison of the endpoints. The technology still remains a great asset for pain researchers to evaluate the impact of a drug in different chronic manifestations on gait and stride in an active task [33]. The high resolution of the Catwalk also enables the visualization of paw positioning on a surface as small as 2.1 $mm^2$. The DWB does not provide this level of precision for digit or ankle positioning but allows for a representative surface calculation and a more direct and precise weight evaluation under free passive and active behaviors in an open environment.

We must also keep in mind that the DWB is a first generation device, which holds the potential for further development. The actual system is limited to a 484 $cm^2$ surface covered with a maximal number of interlaced captors. Increasing the surface of the enclosure to at least 900 $cm^2$ (minimal size of an openfield) would increase the exploration time in the enclosure with regards to the surface. The dimensions of an openfield would provide sufficient space for the rat to walk forward at low velocity and to spend more time exploring for better QoL proxies evaluation. Also, it would increase the odds to monitor BP through sudden weight bearing variations within the distance covered.

## Conclusion

To tackle the challenge of increasing the predictability of preclinical analgesic drug screenings, gait, stride and weight bearing data are becoming increasingly important. DWB assessment in small animals is an important parameter for discomfort evaluation and drug screening. The DWB is technologically superior to the SWB, allowing a complete,

sustained and unbiased evaluation of the weight bearing of every animal limb and accounting for the timely and dynamic behavior of every standpoint. The device also holds potential in evaluating movement-evoked BP episodes, although this was not verified here and needs further investigation. Dynamic evaluation devices like the DWB are among the next generation of instruments that will increase the validity of preclinical models and achieve improved drug screening.

**Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

**Authors' contributions**

PT, M-AD and LD-S carried out the behavioral experiments and data analysis and drafted the manuscript. NB and PS conceived, coordinated and wrote the final version of the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

**Acknowledgements:**

This work was supported by grant MOP-74618 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), awarded to P.S. P.T. is the recipient of a scholarship from NSERC. M-A.D. and L.D.-S. hold scholarships from CIHR. P.S. is a CIHR new investigator and a member of the FRSQ-funded Centre de Recherche Clinique Étienne-Lebel.

**References**

[1] Neugebauer, V., Han, J. S., Adwanikar, H., Fu, Y., Ji, G. Techniques for assessing knee joint pain in arthritis. Mol Pain. 2007,3:8.

[2] Wickman, A. M., Pinzur, M. S., Kadanoff, R., Juknelis, D. Health-related quality of life for patients with rheumatoid arthritis foot involvement. Foot Ankle Int. 2004,25:19-26.

[3] van der Leeden, M., Steultjens, M. P., Terwee, C. B., Rosenbaum, D., Turner, D., Woodburn, J., et al. A systematic review of instruments measuring foot function, foot pain, and foot-related disability in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2008,59:1257-69.

[4] Gok, H., Ergin, S., Yavuzer, G. Kinetic and kinematic characteristics of gait in patients with medial knee arthrosis. Acta Orthop Scand. 2002,73:647-52.

[5] Portenoy, R. K., Bruns, D., Shoemaker, B., Shoemaker, S. A. Breakthrough pain in community-dwelling patients with cancer pain and noncancer pain, part 2: impact on function, mood, and quality of life. J Opioid Manag. 2010,6:109-16.

[6] Mercadante, S., Villari, P., Casuccio, A. An Italian survey on the attitudes in treating breakthrough cancer pain in hospice. Support Care Cancer. 2010.

[7] Fine, P. G. The Diagnosis and Treatment of Breakthrough Pain. New York: Oxford University Press; 2008.

[8] Mercadante, S. Breakthrough pain: on the road again. Eur J Pain. 2009,13:329-30.

[9] Portenoy, R. K., Hagen, N. A. Breakthrough pain: definition, prevalence and characteristics. Pain. 1990,41:273-81.

[10] Mercadante, S., Zagonel, V., Breda, E., Arcara, C., Gebbia, V., Porzio, G., et al. Breakthrough pain in oncology: a longitudinal study. J Pain Symptom Manage. 2010,40:183-90.

[11] Kissin, I. The development of new analgesics over the past 50 years: a lack of real breakthrough drugs. Anesth Analg. 2010,110:780-9.

[12] Basbaum, A. I., Bushnell, M. C., Campbell, J. N., Chaplan, S. R., Mantyh, P. W., Porreca, K., et al. Measurement and New Technologies: Rapporteur Report. In: Campbell JN, Basbaum AI, Dray A, Dubner R, Dworkin RH, Sang CN, eds. Emerging Strategies for the Treatment of Neuropathic Pain. Seattle: IASP Press; 2006. p. 361-81.

[13] Min, S. S., Han, J. S., Kim, Y. I., Na, H. S., Yoon, Y. W., Hong, S. K., et al. A novel method for convenient assessment of arthritic pain in voluntarily walking rats. Neurosci Lett. 2001,308:95-8.

[14] Hamers, F. P., Lankhorst, A. J., van Laar, T. J., Veldhuis, W. B., Gispen, W. H. Automated quantitative gait analysis during overground locomotion in the rat: its application to spinal cord contusion and transection injuries. J Neurotrauma. 2001,18:187-201.

[15] Boettger, M. K., Weber, K., Schmidt, M., Gajda, M., Brauer, R., Schaible, H. G. Gait abnormalities differentially indicate pain or structural joint damage in monoarticular antigen-induced arthritis. Pain. 2009,145:142-50.

[16] Vrinten, D. H., Hamers, F. F. 'CatWalk' automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing. Pain. 2003,102:203-9.

[17] Mogil, J. S., Graham, A. C., Ritchie, J., Hughes, S. F., Austin, J. S., Schorscher-Petcu, A., et al. Hypolocomotion, asymmetrically directed behaviors (licking, lifting, flinching, and shaking) and dynamic weight bearing (gait) changes are not measures of neuropathic pain in mice. Mol Pain. 2010,6:34.

[18] Bennett, G. J., Xie, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. Pain. 1988,33:87-107.

[19] Doré-Savard, L., Otis, V., Belleville, K., Archambault, M., Tremblay, L., Beaudoin, J. F., et al. Behavioral, Medical Imaging and Histological Features of a New Rat Model of Bone Cancer Pain. PLoS One. 2010,5:XX.

[20] Baron, R., Griffin, J. W., Dworkin, R. H., Höke, A., Manning, D. C., Max, M. B., et al. Disease-Specific Targets: Rapporteur Report. In: Campbell JN, Basbaum AI, Dray A, Dubner R, Dworkin RH, Sang CN, eds. Emerging Strategies for the Treatment of Neuropathic Pain. Seattle: IASP Press; 2006. p. 241-70.

[21] Mao-Ying, Q. L., Zhao, J., Dong, Z. Q., Wang, J., Yu, J., Yan, M. F., et al. A rat model of bone cancer pain induced by intra-tibia inoculation of Walker 256 mammary gland carcinoma cells. Biochem Biophys Res Commun. 2006,345:1292-8.

[22] Combe, R., Bramwell, S., Field, M. J. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: a model of chronic nociceptive pain in rats? Neurosci Lett. 2004,370:236-40.

[23] Fernihough, J., Gentry, C., Malcangio, M., Fox, A., Rediske, J., Pellas, T., et al. Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. Pain. 2004,112:83-93.

[24] King, T., Rao, S., Vanderah, T., Chen, Q., Vardanyan, A., Porreca, F. Differential blockade of nerve injury-induced shift in weight bearing and thermal and tactile hypersensitivity by milnacipran. J Pain. 2006,7:513-20.

[25] Hay, C. H., Trevethick, M. A., Wheeldon, A., Bowers, J. S., de Belleroche, J. S. The potential role of spinal cord cyclooxygenase-2 in the development of Freund's complete adjuvant-induced changes in hyperalgesia and allodynia. Neuroscience. 1997,78:843-50.

[26] Wilson, A. W., Medhurst, S. J., Dixon, C. I., Bontoft, N. C., Winyard, L. A., Brackenborough, K. T., et al. An animal model of chronic inflammatory pain: pharmacological and temporal differentiation from acute models. Eur J Pain. 2006,10:537-49.

[27] Coulthard, P., Simjee, S. U., Pleuvry, B. J. Gait analysis as a correlate of pain induced by carrageenan intraplantar injection. J Neurosci Methods. 2003,128:95-102.

[28] Butler, R. K., Finn, D. P. Stress-induced analgesia. Prog Neurobiol. 2009,88:184-202.

[29] Imbe, H., Iwai-Liao, Y., Senba, E. Stress-induced hyperalgesia: animal models and putative mechanisms. Front Biosci. 2006,11:2179-92.

[30] Chesler, E. J., Wilson, S. G., Lariviere, W. R., Rodriguez-Zas, S. L., Mogil, J. S. Influences of laboratory environment on behavior. Nat Neurosci. 2002,5:1101-2.

[31] Piesla, M. J., Leventhal, L., Strassle, B. W., Harrison, J. E., Cummons, T. A., Lu, P., et al. Abnormal gait, due to inflammation but not nerve injury, reflects enhanced nociception in preclinical pain models. Brain Res. 2009,1295:89-98.

[32] Bozkurt, A., Deumens, R., Scheffel, J., O'Dey, D. M., Weis, J., Joosten, E. A., et al. CatWalk gait analysis in assessment of functional recovery after sciatic nerve injury. J Neurosci Methods. 2008,173:91-8.

[33] Gabriel, A. F., Marcus, M. A., Honig, W. M., Walenkamp, G. H., Joosten, E. A. The CatWalk method: a detailed analysis of behavioral changes after acute inflammatory pain in the rat. J Neurosci Methods. 2007,163:9-16.

# Article 2

## Spinal NTS2 Receptor Activation Reverses Signs of Neuropathic Pain

**Auteur de l'article : Pascal Tétreault[1],** Nicolas Beaudet[1], Amélie Perron[2], Karine Belleville[1], Adeline René[3], Florine Cavelier[3], Jean Martinez[3], Thomas Stroh[4], Ashley M. Jacobi[5], Scott D. Rose[5], Mark A. Behlke[5], Philippe Sarret[1,#]

[1] Department of Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.
[2] Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University, Uji, Kyoto, Japan.
[3] Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR-CNRS-5247, Universités Montpellier I & II, Montpellier, France.
[4] Department of Neurology and Neurosurgery, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montréal, Québec, Canada.
[5] Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, Iowa, USA.

**Statut de l'article :** Publié dans *The FASEB journal, 27, 3741-3752 (2013).*

**Avant-propos :** Dans cet article, j'ai réalisé la totalité des expériences et des analyses comportementales et de qPCR. J'ai monté l'ensemble des figures associées aux expériences que j'ai réalisées et rédigé la première version de l'article. J'ai ensuite préparé et réalisé la soumission de l'article en ligne. J'ai finalement contribué à la réponse aux évaluateurs pour l'acceptation finale.

**Résumé de l'article traduit en français :**

Le défi que pose la gestion des douleurs neuropathiques périphériques est important puisque les patients souffrant de douleur chronique répondent relativement mal à la pharmacopée actuelle. Depuis quelques années, le récepteur à la neurotensine (NT) couplé aux protéines G NTS2 est apparu comme une cible intéressante pour traiter certains états douloureux transitoires. Aucune évidence n'est toutefois disponible à ce jour quant à son implication dans les neuropathies périphériques chroniques. Dans l'article présenté ici, nous avons trouvé que le récepteur NTS2 était fortement localisé au niveau des afférences primaires ainsi que dans les cornes dorsales superficielles de la moelle épinière. Ensuite, suivant une ligature au niveau du nerf sciatique (modèle CCI), nous avons observé une fluctuation importante, au courant de l'évolution temporelle de la neuropathie, en ce qui a

trait à l'expression génique de la NT, et des récepteurs NTS1 et NTS2. Nous avons également évalué l'effet d'une injection centrale d'agoniste sélectif au récepteur NTS2 sur l'allodynie mécanique (réponse réflexive évoquée par un stimulus) ainsi que sur les adaptations comportementales de répartition du poids (pouvant être perçus comme des paramètres de qualité de vie et d'inconfort). Le JMV431, la lévocabastine ainsi que la β-lactotensine, tous des agonistes du récepteur NTS2, ont été en mesure de diminuer l'allodynie mécanique continue observée chez les animaux neuropathiques. De façon comparable, l'amytriptyline, la prégabaline et la morphine, constituant des traitements actuels de première et de deuxième ligne pour la douleur neuropathique, ont atténué ce phénomène d'hypersensibilité mécanique induit par le modèle CCI. Les agonistes du récepteur NTS2 ont de plus été efficaces pour renverser les déficits posturaux et les troubles de distribution pondérale causées par le dommage nerveux. Toutefois, les molécules de référence actuellement utilisées en clinique n'ont pas été en mesure d'améliorer de façon significative ces différents paramètres se rapprochant de la réalité clinique. À la lumière de nos résultats, les agonistes NTS2 semblent représenter une nouvelle avenue thérapeutique afin de diminuer les douleurs associées aux neuropathies périphériques, et améliorer la réhabilitation fonctionnelle et le bien-être.

# Spinal NTS2 Receptor Activation Reverses Signs of Neuropathic Pain

**Pascal Tétreault[1], Nicolas Beaudet[1], Amélie Perron[2], Karine Belleville[1], Adeline René[3], Florine Cavelier[3], Jean Martinez[3], Thomas Stroh[4], Ashley M. Jacobi[5], Scott D. Rose[5], Mark A. Behlke[5], Philippe Sarret[1,#]**

[1] Department of Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.

[2] Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University, Uji, Kyoto, Japan.

[3] Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR-CNRS-5247, Universités Montpellier I & II, Montpellier, France.

[4] Department of Neurology and Neurosurgery, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montréal, Québec, Canada.

[5] Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, Iowa, USA.

Short title: NTS2 agonists reduce pain induced by nerve injury

Number of Pages: 41
Number of words for Abstract: 198
Number of words for Introduction: 496
Number of Figures: 4
Number of Tables: 2
Number of words for Discussion: 1572

[#] **Corresponding author:**

**Philippe Sarret, Ph.D**
Department of Physiology and Biophysics
Faculty of Medicine and Health Sciences,
University of Sherbrooke
3001, 12th Avenue North
Sherbrooke, Quebec, J1H 5N4
Canada
Tel: (819) 820-6868, ext: 12554
Fax: (819) 820-6887
Email: Philippe.Sarret@USherbrooke.ca

**Abbreviations**

AMI (Amitriptyline)

BSA (Bovine Serum Albumin)

CCI (Chronic Constriction Injury)

DRG (Dorsal Root Ganglia)

DWB (Dynamic Weight Bearing)

GPCR (G-Protein-Coupled Receptors)

MS (Morphine Sulfate)

NGS (Normal Goat Serum)

NPY (Neuropeptide Y)

PFA (Paraformaldehyde)

PGB (Pregabalin)

PWT (Paw Withdrawal Threshold)

qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction)

SC (Spinal Cord)

**Abstract**

Management of painful peripheral neuropathies remains challenging, since chronic pain patients respond poorly to the available pharmacopeia. In recent years, the G-protein-coupled receptor neurotensin (NT) type 2 (NTS2) emerged as an attractive target for treating transitory pain states. To date, however, there is no evidence for its role in the regulation of chronic peripheral neuropathies. Here, we found that NTS2 receptors were largely localized to primary afferent fibers and superficial dorsal horns. Changes in the time-course of the gene expression profile of NT, NTS1, and NTS2 were observed over a 28-day period following the sciatic nerve constriction (CCI model). We next determined the effects of central delivery of selective-NTS2 agonists to CCI-injured rats on both mechanical allodynia (evoked withdrawal responses) and weight-bearing deficits (discomfort and quality-of-life proxies). NTS2 analogs JMV431, levocabastine and beta-lactotensin were all effective in reducing ongoing tactile allodynia in CCI-operated rats. Likewise, amitriptyline, pregabalin, and morphine significantly attenuated CCI-induced mechanical hypersensitivity. NTS2 agonists were also efficient in reversing weight-bearing and postural deficits caused by nerve damage, unlike reference analgesics currently used in the clinic. Thus, NTS2 agonists may offer new treatment avenues for limiting pain associated with peripheral neuropathies and improve functional rehabilitation and well-being.

**Keywords:** GPCR, allodynia, incapacitance, weight bearing deficits.

## 1. Introduction

Peripheral nerve injury leading to chronic neuropathic pain, arising from diverse etiologies like trauma, infection, disease or chemotherapy, is one of the most difficult types of pain to manage (1). To date, the pharmacological management of neuropathic pain is based on the use of antidepressants (e.g. amitriptyline), antiepileptics (gabapentin, pregabalin) and topical lidocaine as first-line treatment options, the use of opioid analgesics (e.g. morphine) and tramadol being recommended for second-line treatments (2-4). Nonetheless, no more than half of patients achieve clinically meaningful pain relief with the pharmacopoeia currently available (5, 6). Their ineffectiveness is mainly related to the fact that some forms of neuropathic pain are insensitive to classical analgesics or that adverse effects (e.g. constipation, drowsiness, dizziness) drive an important number of patients to stop taking their medications (7-9, 10, 11). Thus, there is a continuing need to develop safe and more effective drugs to improve neuropathic pain management.

The key positioning and signaling properties of G-protein-coupled receptors (GPCRs) at the cellular membrane makes them the most targeted protein families in pharmacology today. About one-third of currently marketed drugs rely on direct interaction with GPCRs or act through GPCR-associated mechanisms (12, 13). In recent years, the neurotensin (NT) tridecapeptide, exerting its biological effects by interacting with two subtypes of class A GPCRs, termed as NTS1 and NTS2 has emerged as an important modulator of nociceptive transmission (14-16). Indeed, central delivery of stable NT analogs produces dose-dependent antinociception in response to different experimental pain

modalities, including thermal, mechanical and chemical stimuli (17-27). Accordingly, inhibition of NTS1 or NTS2 function by pharmacological NT receptor antagonists, antisense technologies or generation of knockout animals supports the involvement of these receptors in the regulation of pain processing (19, 25, 28-34). In light of the fact that neuropathic pain conditions are only partially responsive to opioid therapy, it is also important to point out that NT exerts its analgesic effects at least in part through opioid-independent mechanisms (35, 36). Notably, it was pharmacologically demonstrated that the antinociceptive response induced by NT analogs could not be reversed by the opioid antagonists naloxone and naltrexone (37-40). Above all, it has also been recently demonstrated that NT agonists combined with opioids may act synergistically to reduce nociception (17, 41, 42).

In the present study, we sought to determine whether spinal NTS2 receptor activation could alleviate neuropathic pain symptoms. For this purpose, the effectiveness of different NTS2 agonists in reversing pain behaviors induced by a sciatic nerve constriction was evaluated over a 28-day period, and tested in parallel to the actual prescribed drugs used as first- or second-line treatment options. Neuropathic rats were subjected to different behavioral tests, including evoked withdrawal responses (e.g. mechanical allodynia) and assessment of weight-bearing deficits and quality-of-life proxies (e.g. functional rehabilitation). Since a high degree of plasticity is observed in both sensory neurons and spinal cord in response to nerve injury (43-45), we also examined the time-course gene expression profiles of NT, NTS1, and NTS2 over the 28-day testing period.

## 2. Material and methods

### *2.1. Animals*

Adult male Sprague Dawley rats (200-225 g; Charles River Laboratories, St-Constant, QC, Canada) were maintained on a 12hrs light/12hrs dark cycle with access to food and water *ad libitum*. Rats were acclimatized 4 days to the animal facility prior to behavioral studies. The experimental procedures in this study were approved by the Animal Care Committee of the Université de Sherbrooke and were in accordance with policies and directives of the Canadian Council on Animal Care.

### *2.2. Chronic constriction injury model*

Following baseline measurements, adult rats underwent a surgical procedure to induce a chronic neuropathic pain state. Animals were randomly allocated to one of two surgical groups, i.e., neuropathic or sham. Neuropathic pain was induced through chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve, as previously described by Bennett (46) with a modification in the suture used (5-0 Prolene, Ethicon, inc. Somerville, New Jersey) in order to minimize suture-induced inflammation. Briefly, under isoflurane anesthesia (induction with 5% and maintained at 2.5%; Abbott Laboratories, Montreal, QC, Canada), the left sciatic nerve was loosely ligatured with 4 sutures distant by 1 mm upstream of the tibial, sural and common peroneal nerve trifurcation. This left side was defined as the operated-ipsilateral limb, while the non-operated leg (right) represented the contralateral side. The muscle, conjunctive tissue and skin were then closed with proper sutures and washed with 3% v/v hydrogen peroxide. Sham-operated rats received the same surgical

procedure, except that the sciatic nerve was not ligated. Rats were housed individually for 24 h to recover from the surgery before to be housed at four animals per cage.

*2.3. Animal injection and drugs*

Behavioral experiments aimed at establishing the effects of NTS2 analogs on neuropathic pain behaviors. To this end, rats were lightly anesthetized with 2% isoflurane (Abbott Laboratories, Montreal, QC, Canada) and injected intrathecally, at the L5-L6 intervertebral space, with either JMV-431 (3 to 90 μg/kg), levocabastine (5 μg/kg, kindly provided by Janssen Research, Beerse, Belgium), or β-lactotensin (180 μg/kg, National Institute of Mental Health's chemical synthesis and drug supply program) diluted in physiological saline (0.9% NaCl), 18 min before behavioral testing. Control animals received physiological saline. Reference drugs were used as follow, morphine sulphate (MS) (3 mg/kg, subcutaneous injection, Sandoz, Boucherville, Canada), amitriptyline (AMI) (10 mg/kg, intraperitoneal injection, Sigma Aldrich, USA) and pregabalin (PGB) (30 mg/kg, intraperitoneal injection, Pfizer, UK).

*2.4. Behavioral studies*

Pain-related behavioral parameters were examined at day 0 (pre-surgical baseline (BL)) and after nerve injury at 3, 7, 14, 21 and 28 days. Animals were habituated to the behavioral testing room at 8 a.m. The behavioral assessment began one hour later. Mechanical allodynia (e.g. pain produced by a non-noxious stimulus) and weight-bearing deficits (e.g. functional rehabilitation) were used as outcome measures of neuropathic pain development and as indicators of drug's analgesic efficacy. Dynamic weight bearing measurements were conducted immediately after performing the von Frey filament test.

To determine the presence of mechanical allodynia, animals were placed into compartment enclosures on an elevated wire mesh floor. A dynamic plantar aesthesiometer (Ugo Basile, Stoelting, IL, USA), consisting of a metal probe (0.5 mm diameter), was directed against the hind paw pad and an upward force was exerted (3.33 g/second). The force required to elicit a withdrawal response was measured in grams and automatically registered when the paw was withdrawn or the preset cut-off was reached (50 g). Five values were taken alternately on both ipsilateral (operated side) and contralateral hind paws at 15 s intervals. Rats were acclimatized to the enclosures for 2 days prior to testing.

The dynamic weight-bearing (DWB) device (Bioseb, Boulogne, France) was used to evaluate the discomfort and quality-of-life proxies. This recently characterized apparatus (47) consists of a Plexiglas enclosure (22 × 22 × 30 cm) with a floor sensor composed of 44 x 44 captors (10.89 $mm^2$ per captor). A camera was appointed to the side of the enclosure. The rat was allowed to move freely within the apparatus for 5 min while the pressure data and live recording were transmitted to a laptop computer via a USB interface handle. Raw pressure and visual data were colligated with the latest DWB software available at the time. A zone was considered valid when the following parameters were detected: ≥ 4 g on one captor with a minimum of 2 adjacent captors recording ≥ 1 g. For each time segment where the weight distribution was stable for more than 0.5 sec, zones that met the minimal criteria were then validated and assigned as either right or left hind paw or front paw by an observer according to the video and the scaled map of activated captors. Other detected zones (tail, testicles, etc.) were also validated and analyzed. Finally, a mean value for the weight on every limb was calculated for the whole testing period and further reported on

the animal weight to obtain the percentage of total body weight on each paw. The time corresponding to weight bore on each paw was also available in the final analysis, lending the possibility to assess the frequency of standing behaviors, such as rearing, exploring and grooming. Animals were not acclimatized to the enclosure before the initial testing period in order to maximize exploration behaviors.

*2.5. Western blotting experiments*

Lumbar dorsal root ganglia and spinal cord, isolated from adult Sprague-Dawley rats were homogenized separately with a polytron in 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) and 4 mM EDTA with protease inhibitors (Complete$^{TM}$ Protease inhibitors tablets, Roche Molecular Biochemicals, Laval, QC, Canada), and centrifuged at 4$^{o}$C for 10 min at 46 000 rpm. The pellets were then resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) and 0.2 mM EDTA with protease inhibitors, by vortexing and brief sonication. The membranes were subsequently denatured using Laemmli sample buffer, resolved using 8% Tris-Glycine precast gels (Invitrogen, Burlington, ON, Canada), and transferred to nitrocellulose membranes (BioRad laboratories, Mississauga, ON, Canada). Each lane represents the transfer of 60 µg of membrane protein. Non-specific sites were blocked by 0.1% Tween 20 and 10% milk powder (Carnation, Don Mills, ON, Canada) in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) overnight at 4$^{o}$C. Immunoblotting was performed as previously described (26, 48). Briefly, nitrocellulose membranes were incubated overnight at 4$^{o}$C with the N-terminal specific anti-NTS2 rabbit antibody (1/10,000; made on demand by Affinity BioReagents, ABR, Golden, Co, USA) in PBS with 1% BSA and 1% ovalbumin. After washing with PBS-Tween, blots were incubated for 60 min at room temperature (RT) with an HRP-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (1/4000; Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfe,

QC, Canada) in PBS with 5% milk powder and proteins were visualized by using an enhanced chemiluminescent detection system (Perkin Elmer, Life Sciences, Boston, MA, USA).

*2.6. Light and confocal microscopic studies*

Adult Sprague-Dawley rats were deeply anesthetized with ketamine 87 mg/kg / xylazine 13 mg/kg administered intramuscularly (300 µl) and perfused transaortically with a freshly prepared solution of 4% PFA in 0.1 M Phosphate Buffer (PB), pH 7.4. Tissues were rapidly removed, cryoprotected overnight in 0.1 M PB, containing 30% sucrose at 4°C, and frozen for 1 min in isopentane at -40°C. Spinal cords were sectioned transversely at 30 µm on a Leica SM2000R sliding microtome and DRGs were cut on a Leica CM1850 cryostat at 20 µm. Sections were then incubated overnight at 4°C in anti-NTS2 rabbit antiserum diluted 1/10,000. Immunostaining was performed according to the avidin-biotin peroxidase method (Elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, ON, Canada) using a nickel-intensified diaminobenzidine protocol to localize the horseradish peroxidase immunoreaction product, as described previously (48). For specificity control, sections were incubated overnight with primary antiserum pre-adsorbed with 2 µg/ml of the NTS2 amino-terminal peptide. Reacted sections were mounted on chrome alum/gelatin-coated slides, dehydrated in graded ethanol, defatted in xylene, and mounted with Permount (Fisher Scientific, Montreal, QC, Canada). Labeled structures were examined under bright-field illumination with a Leica DM-4000 automated research microscope (Leica, Dollard-des-Ormeaux, QC, Canada) and digitized images were obtained with a Lumenera Infinity X-21 digital camera using Infinity Capture software (Lumenera Corporation, Ottawa, ON, Canada). For confocal microscopic studies, sections from both spinal cord and DRG were

incubated overnight with rabbit NTS2 antiserum. The primary antiserum was then localized with an Alexa 594-coupled goat anti-rabbit diluted 1:500 (Molecular Probes). Labeled structures were analyzed by confocal microscopy using the Olympus fluoview FV1000 laser-scanning microscope equipped with an Olympus BX61 automated research microscope.

*2.7. Electron microscopy*

Sections were processed for electron microscopy by using a pre-embedding procedure, as previously described (49). Anesthetized Sprague-Dawley rats were transaortically perfused with a mixture of 3.75% acrolein and 2% PFA. Lumbar spinal cords were removed, postfixed in 2% PFA and cut (50 µm-thick) on a vibratome. Sections were then incubated in a solution of 1% sodium borohydride in PB for 30 min to neutralize free aldehyde groups. Following extensive rinsing with PB, sections were cryoprotected for 30 min by immersion in a mixture of 25% sucrose and 3% glycerol in 0.1 M PB, rapidly frozen in isopentane at -60°C, transferred to liquid nitrogen for one minute and finally thawed in PB at RT. Thawed sections were preincubated for 30 min in 0.1 M TBS (pH 7.4) containing 3% NGS and then incubated for 48 h at 4°C with NTS2 antiserum (1/1800) in PBS containing 0.5% NGS, followed by 2 h at RT with colloidal gold (1 nm)-conjugated goat anti-rabbit antibody (1/50; Cedarlane Laboratories, Hornby, ON, Canada), diluted in PBS containing 0.2% gelatin and 0.8% BSA. After several washes in PBS, sections were fixed for 10 min in 2% glutaraldehyde in 0.1 M PBS and rinsed in 0.2 M citrate buffer, pH 7.4. Immunogold particles were amplified through silver intensification by incubating the sections for 15 min with IntenSE M silver solution (Amersham Pharmacia Biotech). The reaction was stopped by washing in citrate buffer and the sections were post-fixed in 2%

osmium tetroxide in 0.1 M PB for 40 min, dehydrated in graded ethanol and infiltrated with propylene oxide followed by Epon 812 (1:1 then 1:3, respectively). The mixture was replaced by 100% Epon 812 and incubated overnight at 4°C followed by placement between two sheets of acetate at 60°C for 24 h for flat-embedding. Ultrathin sections (80 nm-thick) were collected and counterstained with uranyl acetate/lead nitrate and examined with a JEOL 100CX transmission electron microscope (M.E.C.A Ltée, Montreal, QC, Canada). Electron microscopic negatives were digitized using a high-resolution digital camera and processed using Adobe Photoshop. Light microscopic photomicrographs and color images were adjusted for contrast and brightness using Adobe Photoshop CS4 software. The final composites were processed by using Deneba's Canvas ™X imaging software on an Apple iMac.

*2.8. Quantitative real-time PCR*

Lumbar DRG (L4 to L6) and spinal cord bulge located in the thoracic region were harvested at specific time-points (BL, 3, 7, 14 and 28 days post-surgery) and immediately put in a volume of RNAlater® solution (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) sufficient to cover the tissue (approx. 100 µl for DRG and 150-300 µl for spinal cord section). RNAlater® stored tissues were conserved according to manufacturer's recommendations. RNA was further extracted using QIAzol Lysis Reagent® and protocol from Qiagen® with the use of TissueLyser II (Qiagen) in order to insure uniform homogenization. Samples were then DNAse treated using Turbo DNase (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). All samples were run on Experion (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) to validate RNA quantity and quality. Reverse transcription was carried out on 1 µg RNA with 160 U Superscript II (Invitrogen, Grand Island, NY, USA), primed with oligo dT and random hexamers

(Integrated DNA Technologies). Samples were then loaded onto 384 well plates with JANUS® Automated Workstation (Perkin Elmer, USA) and Real-Time PCR was further performed in triplicate for each cDNA sample on a 7900HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) using 0.8 U Immolase DNA Polymerase (Bioline). The average NT, NTS1/2 and NPY expression was normalized to *Hprt1* housekeeping gene and compared to healthy animals. Each value represents mean ± SEM of 5-6 samples. DNA oligonucleotides and probes used in the qPCR assay are listed in the following table:

| Gene | Sequence |
|---|---|
| Rn *Hprt1* F217 | 5'-CGAGATGTCATGAAGGAGATGG-3' |
| Rn *Hprt1* R309 | 5'-GTAATCCAGCAGGTCAGCAAAG-3' |
| Rn *Hprt1* P245 | 5'-/56-FAM/ATCACATTG/ZEN/TGGCCCTCTGTGTGCTGAA/3IABkFQ/-3' |
| Rn *Nts* F380 | 5'-GCTGACCGTATTCCAACTCC-3' |
| Rn *Nts* R486 | 5'-CCTTCTCAGTTTTCTCATTGCC-3' |
| Rn *Nts* P441 | 5'-/5HEX/TTATCTCCC/ZEN/AGTGTTGAAAGGCCCG/3IABkFQ/-3' |
| Rn *Ntsr1* F847 | 5'-CACAACGGTTTAGAGCACA-3' |
| Rn *Ntsr1* R953 | 5'-ACAAAGGCAATGACCACA-3' |
| Rn *Ntsr1* P868 | 5'-/56-FAM/ACGTTCAAC/ZEN/ATGACCATCGAGCCGG/3IABkFQ/-3' |
| Rn *Ntsr2* F1010 | 5'-CCCGATGATGGATGGACTAATG-3' |
| Rn *Ntsr2* R1127 | 5'-AAGACACGGCGTTGTAGAG-3' |
| Rn *Ntsr2* P1071 | 5'-/5HEX/ACACGCTCT/ZEN/TCTATGTCAGCTCAGCAGT/3IABkFQ/-3' |
| Rn *Npy* F253 | 5'-GACAGAGATATGGCAAGAGATCC-3' |
| Rn *Npy* R330 | 5'-GCAAGTTTCATTTCCCATCACC-3' |
| Rn *Npy* P382 | 5'-/56-FAM/CCCAGAACA/ZEN/AGGCTTGAAGACCCT/3IABkFQ/-3' |

*2.9. Statistical analysis*

Data were plotted as means ± standard errors of the mean (SEM) for all curves and

bar graphs. Two-way ANOVA, followed by Bonferroni's post hoc test was performed for all curves. Graph bars were analyzed with a Kruskal-Wallis, followed by Dunns' post hoc test. Prism 5 software (GraphPad software Inc, San Diego, CA USA) was used for all statistical calculations and analyses. The percentage of anti-allodynia was calculated with the area under the curve of every treatment for the time period comprised between 3 and 28 days, with the use of the following equation: % anti-allodynia = 100 x [(CCI treated rat – CCI control rat)/(Sham - CCI control rat)]. From the latter formula, 0% represents no anti-allodynic effect of the compound, while 100% corresponds to a complete relief of mechanical hypersensitivity. We use the same formula to calculate the % of rehabilitation, weight recovery and compensation reversal. A significant difference between groups is represented by the P-Value; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$. For the quantitative real-time PCR experiments, statistical analyses were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-hoc tests.

## 3. Results

### *3.1. NTS2 receptor protein distribution in rat dorsal root ganglia and spinal cord*

The presence of NTS2 receptors in lumbar DRG and spinal cord tissues isolated from healthy rats was first assessed by Western Blotting. In both structures, the NTS2 antiserum specifically recognized a protein band at 46 kDa, consistent with the molecular weight of the monomeric form of the receptor, as deduced from its cDNA sequence (Fig. 1A, arrowhead). As previously reported (48), high molecular weight complexes, consistent with receptor dimerization were also detected at approximately 80-85 kDa in homogenates from both DRG and spinal cord (Fig. 1A). Accordingly, intense NTS2-like immunoreactivity was observed within the superficial layers of the spinal dorsal horn and in subsets of primary sensory neurons (Fig. 1B-D). In the dorsal horn, the NTS2-like immunolabeling was prominently concentrated over neuronal processes and was particularly intense over the *substantia gelatinosa*, which receives many synaptic terminations from C and Aδ primary afferent fibers (Fig. 1B,D). Accordingly, strong NTS2 labeling was evident in different subpopulations of primary sensory neurons (Fig. 1C, arrowheads). In somata of small to large ganglion cells, the staining was found to be associated with punctate cytoplasmic vesicle-like structures. Confocal microscopy also revealed the presence of a dense network of NTS2-immunoreactive dendrites pervading the deeper layers of the dorsal horn (Fig. 1D, arrowheads).

We next examined the subcellular distribution of NTS2 receptors in rat spinal *substantia gelatinosa* by electron microscopy (Fig. 1E-H). At the ultrastructural level, the NTS2 silver-intensified gold labeling was primarily associated with large dendritic profiles,

probably originating from spinal neurons localized in laminae IV-V (Fig. 1E,F). Within these dendrites, NTS2-like immunoreactivity was mainly present over intracellular organelles. Only few immunogold-receptor complexes were detected at the plasma membranes (Fig. 1E,F). A strong immunolabeling was also observed over small dendritic profiles, probably stemming from distal dendrites in laminae I/II (Fig. 1G). Only few immunolabeled NTS2 receptors were detected in association with synaptic terminals (Fig. 1G,H; white arrowheads). A small number of these terminals appeared to be peptidergic, as evidenced by the presence of a few large dense core vesicles (Fig. 1G, black arrowhead) in addition to synaptic vesicles. Remarkably, within synaptic terminals NTS2 immunolabeling was quite frequently associated with the plasma membrane (Fig. 1G, white arrowheads). Additionally, sparse NTS2 immunoreactivity was also detected on lightly myelinated axons coursing to the neuropil (Fig. 1H).

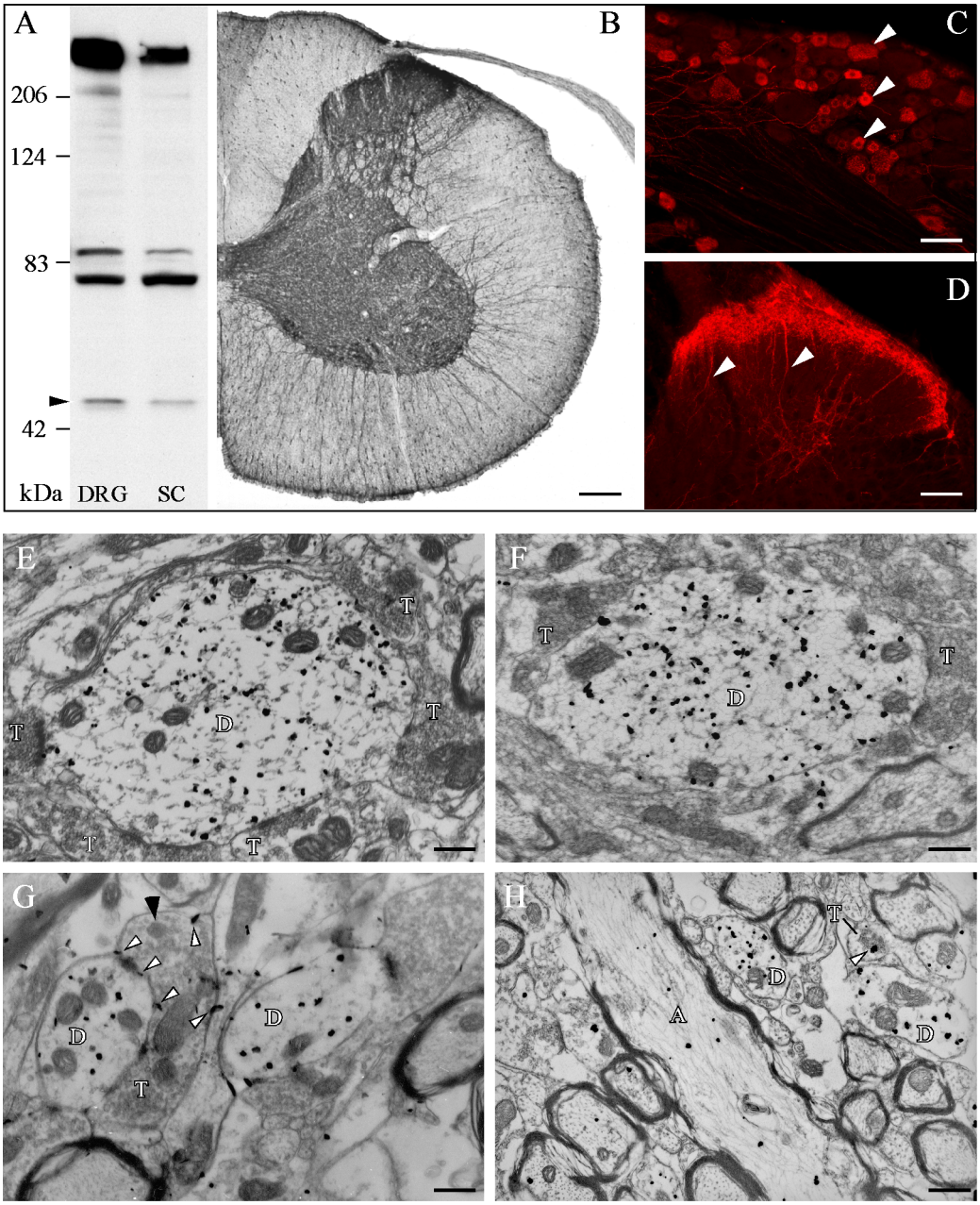



**Figure 1.** *NTS2 receptor protein distribution in rat dorsal root ganglia and spinal cord.* **A,** Identification of endogenously expressed NTS2 receptors by Western blotting. Specific immunoreactive bands at 46 kDa (arrowhead) and 80-85 kDa are detected in homogenates from both dorsal root ganglia (DRG) and spinal cord (SC). **B**, The immunoperoxidase staining reveals the presence of NTS2-like immunoreactivity throughout the dorsal horn of the spinal cord. A dense NTS2-like immunolabeling is observed in the superficial layers of the dorsal horn. **C**, As observed by confocal microscopy, NTS2 receptors are present in all subtypes of sensory neurons, notably in small/medium-sized ganglion cells innervating laminae I and II of the dorsal horn (arrowheads). **D**, The NTS2-like immunolabeling is

most prominent over the *substantia gelatinosa.* Also note that NTS2-immunoreactive dendritic profiles originating in the nucleus proprius radiate into the superficial layers of the dorsal horn and can make synaptic contact with primary afferent fibers (arrowheads). **E,F,** At the ultrastructural level, immunoreactive NTS2 is most frequently found in large dendritic profiles (D). Within these profiles, the silver-enhanced gold particles are typically associated with intracellular organelles. Occasionally, immunoreactive NTS2 is associated with the plasma membrane. These large dendrites are decorated with numerous synaptic terminals, which are, however, typically devoid of NTS2. **G,H,** NTS2-like immunolabeling is also found within smaller dendritic profiles (D), which are abutted by synaptic terminals (T) as well. Infrequently, these terminals are NTS2-immunopositive, albeit lightly as compared with dendritic labeling (white arrowheads). Immunoreactive NTS2 in synaptic terminals is frequently associated with the plasma membrane (white arrowheads in G). **H,** In addition, NTS2 immunolabeling is found in association with lightly myelinated axons (A). Scale bars: B = 400 µm, C = 50 µm, D = 200 µm, E - G = 500 nm, H = 750 nm.

### *3.2. Temporal changes of NT and NT receptor mRNA expression in dorsal root ganglia and dorsal spinal cord following induction of neuropathic pain*

The peripheral and central neural networks involved in the processing of nociceptive information showed extensive plasticity in pathological pain states. Here, we examined whether there was a differential mRNA expression profile of the neurotensinergic system in rat dorsal root ganglia (DRG) and superficial dorsal horns following nerve injury. Quantitative real-time RT-PCR was used to evaluate the temporal pattern (3, 7, 14 and 28 days post-injury) of NT, NTS1, and NTS2 mRNA expression. The data were normalized at every time-point to the *Hprt1* housekeeping gene stably expressed over the whole experimental period. The expression of neuropeptide Y (NPY) was used as a positive control since it was previously reported as up-regulated following nerve injury (50). We found that the chronic constriction injury of the sciatic nerve (CCI model) time-dependently altered NT, NTS1, and NTS2 mRNA expression levels in both DRG and spinal cord (Table 1). A one-way ANOVA analysis revealed that NT mRNA levels isolated from DRG and spinal cord dorsal horn of injured rats were significantly higher than those

measured in non-operated and sham control animals. At all post-operative time-points, NT mRNA levels were significantly increased by 3- to 4-fold in the ipsilateral side of both tissues compared to the non-operated control rats (* $P<0.05$; Table 1). NT mRNA levels were also significantly up-regulated on the contralateral side of the spinal cord. In contrast, very different gene expression patterns were observed for NTS1 and NTS2 in neuropathic rats. Indeed, NTS2 mRNA levels were significantly decreased by approximately 50% on days 14 and 28 post-surgery in both DRG and spinal cord tissues compared to the corresponding time-points in control groups (* $P<0.05$, ** $P<0.01$; Table 1). NTS2 expression was also down-regulated on the contralateral side of the spinal cord. Significant reductions in NTS1 mRNA levels were also observed in DRG at days 14 and 28 after CCI (~55% decrease; ** $P<0.01$; Table 1). However, NTS1 mRNA levels remained unchanged in the dorsal horn of the spinal cord over the 28-day observation period.

TABLE 1. Temporal and spatial alterations in NT, NTS1, and NTS2 mRNA expression following chronic constriction injury of the sciatic nerve.

| DRG | Ipsilateral | | | | Contralateral | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | D3 | D7 | D14 | D28 | D3 | D7 | D14 | D28 |
| **NT** | 2.96 ± 0.57 | *** 3.74 ± 0.55** | 2.80 ± 0.65 | 2.55 ± 0.85 | 1.77 ± 0.41 | 1.92 ± 0.35 | 2.15 ± 0.34 | 2.35 ± 0.70 |
| **NTS1** | 0.72 ± 0.08 | 0.68 ± 0.06 | **** 0.41 ± 0.07** | **** 0.44 ± 0.08** | 0.86 ± 0.08 | 1.02 ± 0.05 | 0.78 ± 0.12 | 0.74 ± 0.06 |
| **NTS2** | 0.96 ± 0.09 | 0.88 ± 0.14 | *** 0.44 ± 0.06** | *** 0.43 ± 0.06** | 0.87 ± 0.05 | 1.11 ± 0.14 | 0.82 ± 0.10 | 0.90 ± 0.12 |
| **NPY** | **** >10 ± 2.76** | ***** >100 ± 8.40** | ***** >100 ± 10.23** | ***** >50 ± 5.90** | 1.21 ± 0.19 | 0.86 ± 0.21 | 0.80 ± 0.12 | ***** 2.03 ± 0.32** |

| Spinal cord | Ipsilateral | | | | Contralateral | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | D3 | D7 | D14 | D28 | D3 | D7 | D14 | D28 |
| **NT** | ***2.24 ± 0.07** | *** 2.06 ± 0.24** | *** 2.16 ± 0.17** | *** 2.05 ± 0.13** | *** 2.00 ± 0.35** | **** 2.22 ± 0.17** | *** 2.15 ± 0.24** | 1.71 ± 0.18 |
| **NTS1** | 1.20 ± 0.10 | 1.50 ± 0.18 | 0.83 ± 0.06 | 0.85 ± 0.10 | 0.86 ± 0.09 | 0.95 ± 0.10 | 0.77 ± 0.08 | 0.68 ± 0.09 |
| **NTS2** | 0.69 ± 0.07 | 0.86 ± 0.07 | *** 0.60 ± 0.06** | **** 0.54 ± 0.05** | *** 0.53 ± 0.04** | 0.65 ± 0.06 | **** 0.48 ± 0.03** | ***** 0.43 ± 0.05** |
| **NPY** | **** 1.90 ± 0.11** | ***** 2.07 ± 0.18** | 1.44 ± 0.16 | 1.60 ± 0.13 | **** 1.71 ± 0.19** | **** 1.70 ± 0.13** | 1.50 ± 0.15 | 1.29 ± 0.14 |

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. control group.

*3.3. NTS2 agonists delivered intrathecally attenuate nerve-injury induced mechanical hypersensitivity*

Hypersensitivity to mechanical stimuli is a characteristic escape behavior observed following a chronic constriction injury of the sciatic nerve. Accordingly, the paw withdrawal threshold (PWT) in response to innocuous tactile stimuli significantly decreased on the ipsilateral side 3 days post-surgery and remained low for at least 28 days compared with pre-surgery baseline values (*** $P<0.001$; Fig. 2). As previously observed (21), no significant changes in PWT occurred on the contralateral hind paw (not shown). Sham-operated rats did not develop mechanical allodynia throughout the 4-week testing period (Fig. 2). We thus examined whether drugs acting at NTS2 receptors could alleviate the neuropathic pain behaviors. Intrathecal (i.t.) injection of the selective and stable NTS2 agonist JMV-431 reduced ongoing tactile allodynia in a dose-dependent manner from day 3 to 28, achieving a 71.4 ± 5.4 % pain relief at the highest dose tested (90 µg/kg; *** $P<0.001$; Fig. 2A, C). Punctual i.t. delivery of two other NTS2 agonists, levocabastine (5 µg/kg) and β-lactotensin (180 µg/kg) also produced anti-allodynic effects in CCI rats, inducing a 55.5 ± 6.5 % and 28.2 ± 3.9 % recovery over the 28-day period, respectively (*** $P<0.001$; Fig. 2B, C).

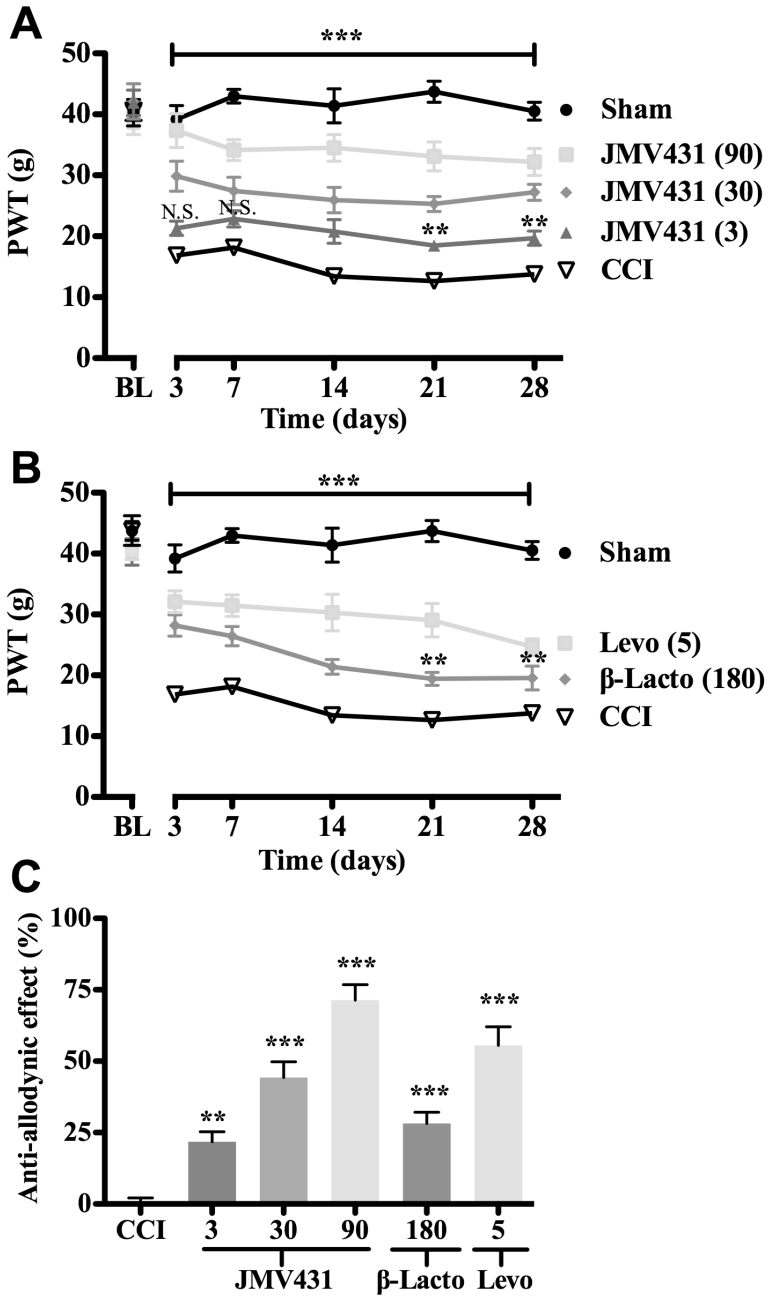



**Figure 2:** *Effect of NTS2 agonists on mechanical allodynia induced by CCI of the sciatic nerve in rats.* The paw withdrawal threshold (PWT) following automated von Frey hair stimulation was measured at various time-points following induction of neuropathic pain. Paw withdrawal thresholds were determined following acute intrathecal injection of three doses of JMV431 (3, 30 and 90 µg/kg; **A**), levocabastine (5 µg/kg; **B**), and β-lactotensin (180 µg/kg; **B**) at days 3, 7, 14, 21 and 28 post-surgery. BL indicates baseline prior to CCI surgery. Statistical analyses were performed with a two-way ANOVA followed by a Bonferroni's post-test, comparing NTS2 agonist treatments to corresponding saline-treated

control at each time point. **C,** Calculations of anti-allodynic effects from testing time-points day 3 to day 28 showed that all tested compounds attenuated the development of hypersensitivity to mechanical stimulus. A one-way ANOVA followed by a Bonferroni's post-test was performed to detect differences between groups of CCI rats treated spinally with either saline or NTS2 agonists. Data shown as mean ± SEM (6-8 rats/group for NT-compounds, 10-15 rats/group for CCI and Sham). For all analyses, ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$, compared to CCI saline-treated groups.

The effectiveness of actual prescribed drugs used as first- or second-line treatment options for the pharmacological management of neuropathic pain was tested in parallel to the drugs acting at NTS2 sites. For this purpose, CCI rats were treated with amitriptyline (10 mg/kg), pregabalin (30 mg/kg), and morphine (3 mg/kg) at doses that were previously shown to be effective in reversing nociceptive behaviors (51-53). Accordingly, we found that all drugs partially reversed the mechanical allodynia at various times after CCI (Fig. 3A). Indeed, over the 28-day post-surgery period, systemic administration of amitriptyline, pregabalin, or morphine induced significant increases in PWT compared to the vehicle-treated group, reversing by 57.8 ± 8.2 %, 27.7 ± 4.1 %, and 27.9 ± 1.9 % the allodynic state, respectively (*** $P<0.001$; Fig. 3B).

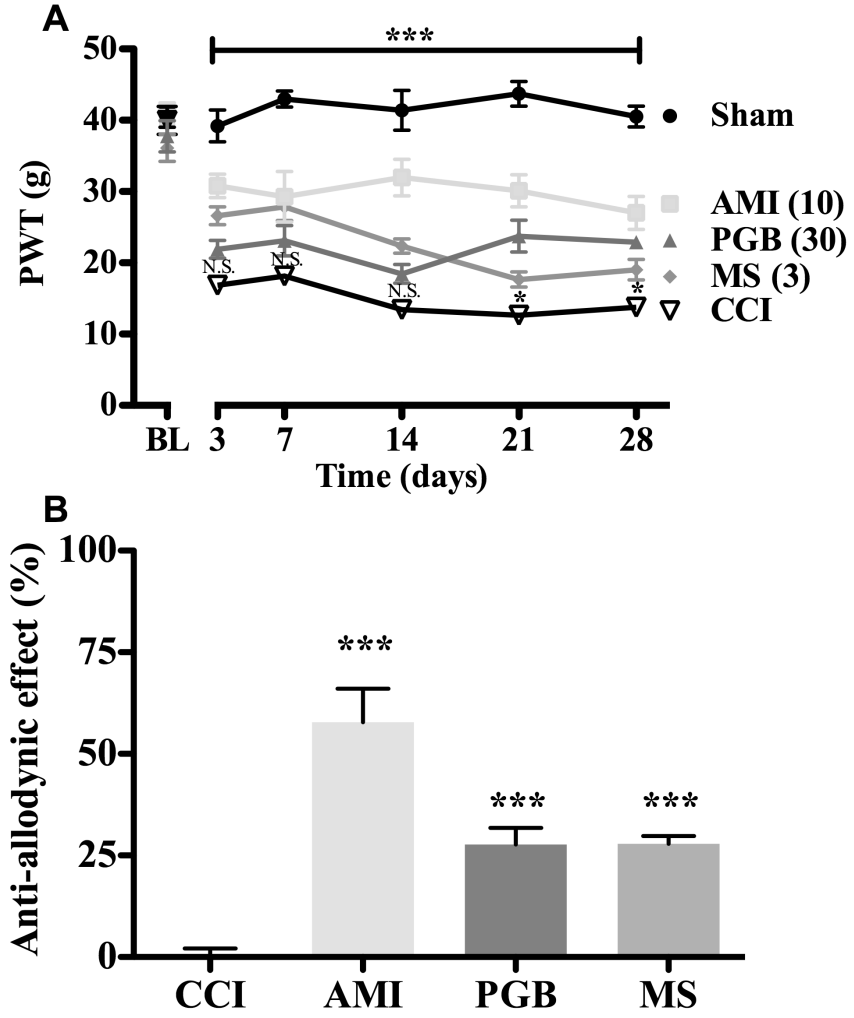



**Figure 3:** *Effects of systemic administration of amitriptyline, pregabalin, and morphine on mechanical sensitivity in neuropathic rats.* Mechanical hypersensitivity was observed by a decreased withdrawal threshold of the ipsilateral hind paw (PWT) in response to an innocuous tactile stimulus. **A,** The time course of mechanical allodynia was examined in CCI- and sham-operated rats during the 4-week period after the surgery. Data were analyzed statistically using a two-way ANOVA followed by a Bonferroni's post-test. * $P<0.05$ and *** $P<0.001$ compared amitriptyline (10 mg/kg), pregabalin (30 mg/kg), or morphine (3 mg/kg) to corresponding vehicle thresholds at each time point. N.S. stands for not significant. **B,** Both first- and second-line drugs were effective in reversing mechanical allodynia in nerve-injury rats. A one-way ANOVA followed by a Bonferroni's post-test was used to evaluate the drug treatment effectiveness. For all analyses, *** $P<0.001$. Data shown as mean ± SEM (6-8 rats/group for reference compounds, 10-15 rats/group for CCI and Sham).

*3.4. NTS2 agonists reduce neuropathy-induced weight bearing deficits and improve the quality-of-life proxies*

To date, the evaluation of putative analgesics relies mainly on the measurement of evoked withdrawal responses (e.g. mechanical allodynia). However, recent advances in the field suggest that pre-clinical drug development process should also include the assessment of functional deficits and well-being in addition to pain relief (54, 55). We recently demonstrated in various animal pain models that dynamic weight bearing (DWB) allowed to measure proxies of the quality-of-life in freely moving rats (47, 56). Here, we used a DWB device to monitor the effects of NTS2 agonists and reference drugs on different quality-of-life proxies, including time-of-use of the injured limb, weight load deficits, and compensatory shifts in weight distribution.

We first evaluated in CCI rats the effectiveness of drug treatment in reversing the decrease in the use of the affected limb (Fig. 4). Drug effects were expressed as the percentage of rehabilitation over the 28-day period, where 100% corresponds to a complete recovery of the injured paw utilization. Our results revealed that both JMV-431 and levocabastine significantly improved the time of ambulation spent on the injured paw, rehabilitating the functionality of the limb to 74.8 ± 15.9 % and 87.6 ± 5.0 %, respectively (* $P<0.05$; Fig. 4A). At the dose used, β-lactotensin was unable to restore the functionality. Using the same paradigm, we also demonstrated that amitriptyline increased the use of the injured limb (82.6 ± 7.9 % reversal; ** $P<0.01$), whereas pregabalin and morphine were mostly ineffective (Fig. 4B).

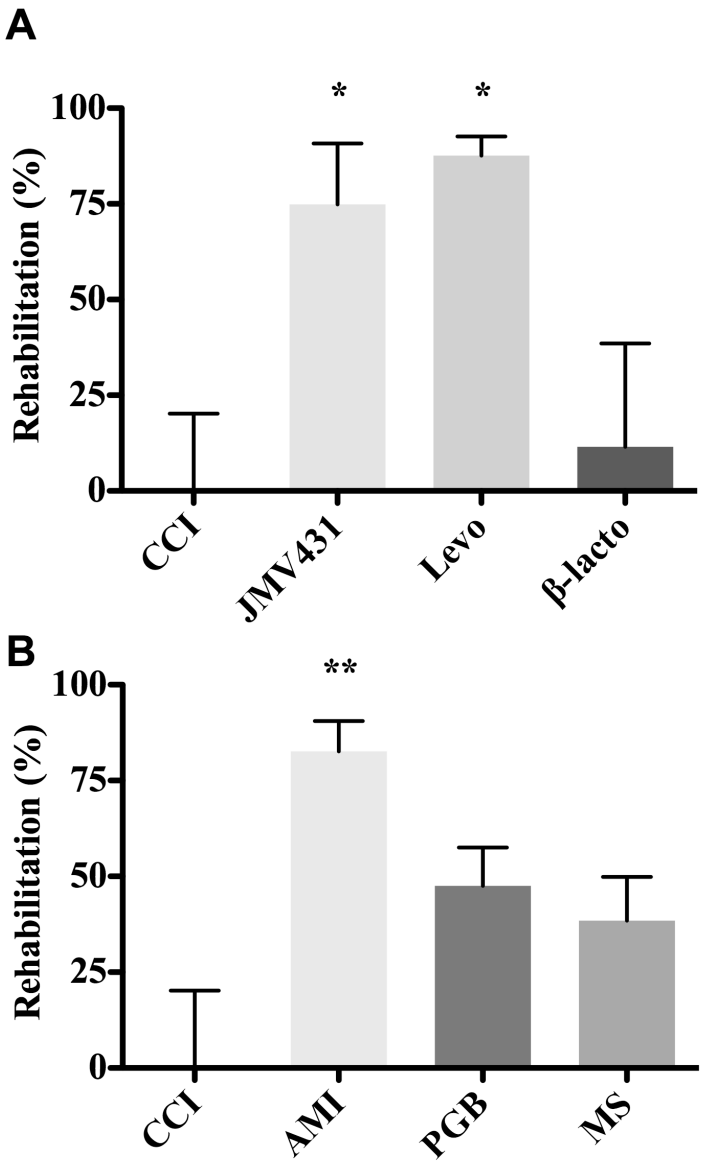



**Figure 4:** *Effects of NTS2 agonists and common analgesics on neuropathy-induced decrease in time-of-use of the injured limb.* The effectiveness of drug treatment was determined by measuring the percentage of functional rehabilitation, 100% corresponding to a full recovery in the use of the affected limb. Improvement of the time of ambulation spent on the ipsilateral paw was determined using the DWB device over the 28-day period. Functional recovery of the affected limb was followed after acute administration (**A**) of JMV431 (90 µg/kg), Levocabastine (5 µg/kg) and β-lactotensine (180 µg/kg) or (**B**) of the clinically used analgesics, amitriptyline (10 mg/kg), pregabalin (30 mg/kg), and morphine (3 mg/kg). A one-way ANOVA followed by a Bonferroni's post-test was applied to compare rats receiving drugs and CCI rats treated with saline. * $P<0.05$ and ** $P<0.01$. Data shown as mean ± SEM (6-8 rats/group for all drugs, 10-15 rats/group for CCI and Sham).

We next measured the weight bearing deficits across the four limbs in non-restrained neuropathic rats (figure 5). The load on the affected limb was in average decreased by 55% ± 3.0 from day 3 to 28 and compensated by a weight shift to the forepaws and contralateral hind paw (not shown). I.t. delivery of JMV-431 and levocabastine both reversed CCI-induced ipsilateral paw weight load deficits, leading to a gain of 25-30% of weight recovery (* $P<0.05$; figure 5 A). However, only the JMV-431 was effective in reducing the compensatory shift on the other limbs (35.3 ± 10.8 % reversal, * $P<0.05$; figure 5 C). In contrast, β-lactotensin and all reference drugs used in this study were inefficient in improving these quality-of-life proxies (figure 5 B-D).

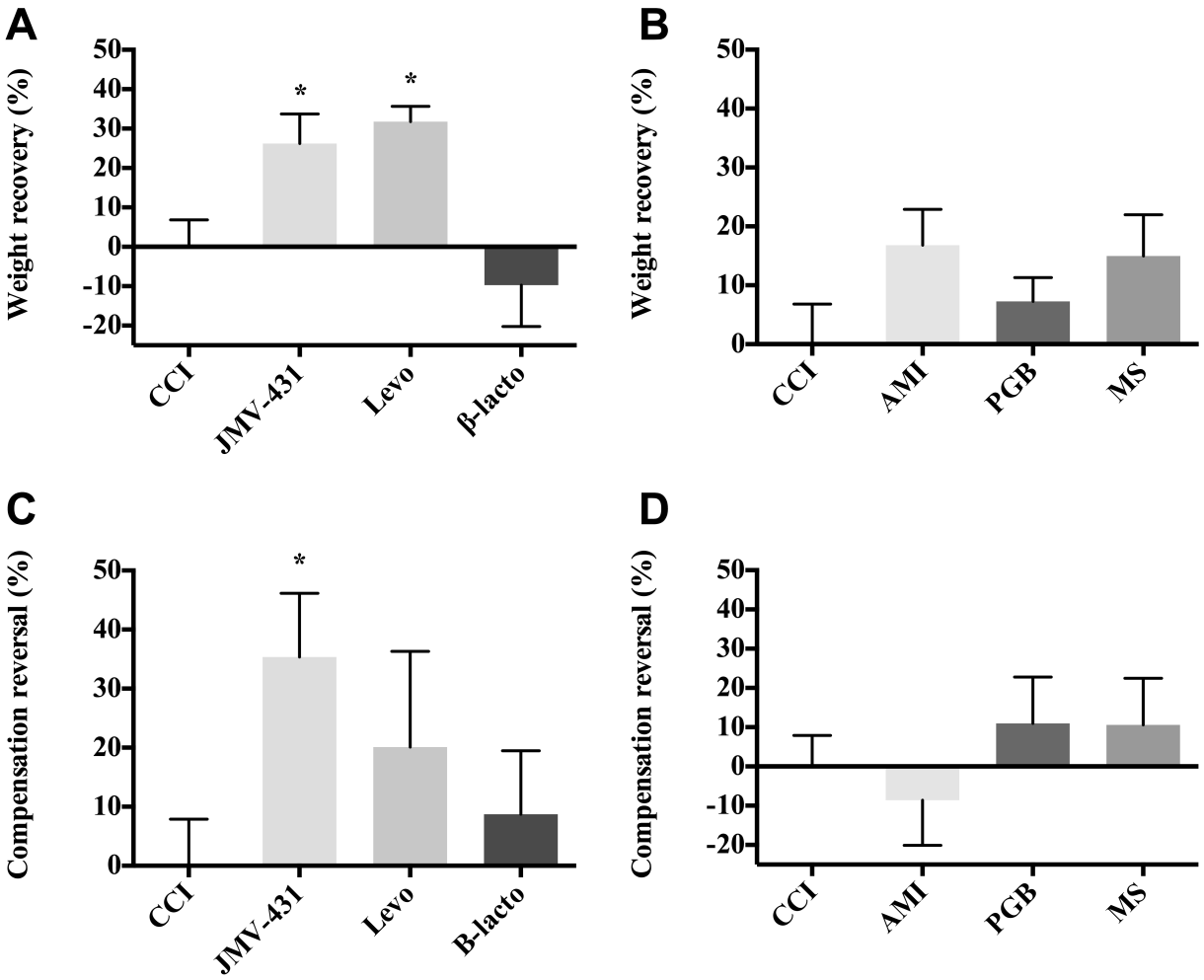



**Figure 5:** *Evaluation of neuropathic pain-induced weight-bearing deficits and weight compensation after the administration of NTS2 agonists or first- and second-line treatments.* Weight recovery or compensation reversal was assessed with the DWB device over the 28 d period. Treatments' effectiveness were determined by measuring the percentage of weight reported on the ipsilateral paw and compensation shifts to the front paws and other anatomical zones; 100% corresponding to a full recovery in the weight bore on the injured paw or a complete weight redistribution to initial baseline values over the four limbs. Acute injection of JMV-431 (90µg/kg) or levocabastine (5µg/kg) induced a significant weight recovery (**A**), while only JMV-431 (90µg/kg) reversed the weight compensation occurring in the CCI model (**C**). The clinically used analgesics AMI (10mg/kg), PGB (30mg/kg) and MS (3mg/kg) were unable to improve these quality-of-life proxies (**B-D**). One-way ANOVA followed by a Bonferroni's post-test was used to compare rats receiving drugs and CCI rats treated with saline. Data are shown as means ± SEM (6-8 rats/group for all drugs, 10-15 rats/group for CCI and sham treatment). *$P < 0.05$.

## 4. Discussion

Chronic neuropathic pain is a common clinical problem worldwide, under diagnosed and undertreated, leading to suffering, disability, impairment of quality-of-life, and increased health care use and costs (1-3). Thus, the development of new pharmacological painkillers stays at the forefront of pain research. According to Overington (57), of the 266 human targets of FDA-approved drugs, 27% correspond to the rhodopsin-like family of GPCRs. There is therefore a broad scientific consensus saying that GPCRs will remain the pre-eminent class of druggable targets and clearly one of most important therapeutic targets in pain medicine (13).

In the past few years, others and we have provided compelling evidence that the neurotensinergic system is involved in the regulation of pain transmission (14, 15, 16). Although there are now clear indications of the contribution of NTS1 and NTS2 receptor subtypes in regulating the nociceptive processes at both spinal and supraspinal levels, their potential role in reducing chronic pain remains mainly unsupported. The present study aimed at investigating the role of spinal NTS2 receptors in the regulation of neuropathic pain symptoms. We first demonstrated that the NTS2 receptor is highly expressed in sensory neurons and in the superficial layers of the spinal dorsal horn. Within DRG, the immunostaining for NTS2 was found in association with different subpopulations of primary sensory neurons. This result is consistent with previous findings demonstrating the presence of immunoreactive NTS2 receptors in a subset of sensory neurons carrying primary nociceptive inputs as well as in NF200-positive large Aβ fibers, which are believed to mediate allodynia (26). NTS2-immunoreactive fibers were also particularly dense over

the substantia gelatinosa and in periphery to lamina II, thus suggesting that a certain proportion of NTS2 receptors may be anterogradely transported to the central terminals of sensory neurons. In the superficial layers of the dorsal horn, immunolabeled NTS2 receptors, detected by immunogold electron microscopy, were mainly observed over dendritic profiles. An important fraction of these NTS2 receptors had an intracellular distribution, indicating that neurons expressing NTS2 hold large pools of receptors. Accordingly, we previously demonstrated using *in vitro* and *in vivo* experiments that NTS2 receptors externalized upon sustained NT stimulation to reach the dendritic plasma membranes of dorsal horn neurons (58). Conversely, the subcellular distribution of NTS2 receptors revealed that a high proportion of NTS2, probably originating from primary afferents, was associated with the plasma membrane in synaptic terminals.

In the present study, we also demonstrated that the mRNA expression profile of the neurotensinergic system was affected following damage to the peripheral nervous system. Notably, the increased expression of NT found here corroborates previous findings demonstrating that the NT peptide is up-regulated in the lumbar spinal cord, 7 days following induction of neuropathic pain by sciatic nerve cuff implantation (59). Consistently, an increase in NT-like immunoreactivity was also observed in large sensory neurons following peripheral axotomy (60). Regarding the gene expression profiles of NT receptors, our data reinforce previous cDNA microarray studies reporting changes in NTS2 expression at both DRG and dorsal spinal horn 14 days after peripheral axotomy (61-63). Overall, our results indicate that the expression patterns of NT, NTS1, and NTS2 are dynamically regulated in both DRG and spinal cord after sciatic nerve constriction.

Over the last 25 years, several preclinical animal models of neuropathic pain have been developed in order to mimic human disease conditions (64, 65). These rodent models of neuropathy have been helpful for elucidating the peripheral and central pathophysiological mechanisms underlying neuropathic pain. They have also been successful for identifying potential new therapeutic targets for the management of neuropathic pain. Among the most commonly used models of peripheral neuropathy, the chronic constriction injury model, developed by Bennett and Xie (46), has been validated in terms of clinical relevance and efficiency for drug screening (66-68). Indeed, this model reproduces sensory deficits seen in neuropathic pain patients, including the development of allodynia against mechanical stimuli and the occurrence of spontaneous painful sensation (intermittent or continuous) (64, 69). Furthermore, the CCI symptoms are also responsive to drugs, which are clinically used for the management of neuropathic pain (51-53, 66-68). Accordingly, we found here that morphine, pregabalin, and amitriptyline were effective in reducing mechanical allodynia in CCI rats. More importantly, the present results demonstrate for the first time the critical role played by NTS2 receptors in the regulation of neuropathic pain hypersensitivity. As we previously demonstrated following administration of the NT native peptide (21), all NTS2 receptor agonists exerted anti-allodynic activity in sciatic nerve-injured animals following spinal delivery. These results strengthened previous studies demonstrating the implication of NTS2 receptors in NT's analgesic effects in acute and tonic pain paradigms. Thus, intracerebroventricular or intrathecal injection of the NTS2-selective agonist JMV-431 induced strong antinociceptive responses in acute, visceral, and formalin pain tests in rodents (24, 26, 30). Likewise, intrathecal or intrarostroventral medullary administration of both NTS2 analogs β-lactotensin and

levocabastine induced analgesia in rats, as measured in the tail-flick test (20, 26, 70, 71). Finally, the NT79 compound, which exhibits higher selectivity to NTS2 also attenuated both formalin-induced nociceptive behaviors and acetic acid-induced writhing responses (17, 27, 72). In line with our previous findings demonstrating that NTS1 agonists produced potent anti-allodynic effects in nerve-injured rats (21), we can thus conclude that the recruitment of both NTS1 and NTS2 receptors mediates the analgesic actions of NT in chronic neuropathic pain conditions. However, since NTS1 agonists were found to induce blood pressure changes and hypothermia, whereas NTS2-selective analogs did not (30, 34, 72-75), NTS2 analogs may therefore represent a better treatment option for painful neuropathies with a reduced side-effect profile.

Despite substantial investments by the pharmaceutical industry over the past 50 years, the currently available pharmacopeia for neuropathic pain management is limited in terms of drug efficacy and undesired effects. Although many potential targets have been identified so far, little progress has been made in developing new, effective, and safe analgesics (76). Indeed, screening of new painkillers at the preclinical level remains limited and often leads to clinical assay abortion. Most successful analgesic development activity has been confined to the production of congeners and reformulation of existing drugs or introduction of drugs designed initially to treat another disease, such as gabapentin, lidocaine, and ketamine (77, 78). Many in the field believe that the problem may lie in part in the poorly predictable techniques used to assess painful behaviors supposed to mimic the clinical reality (54, 55, 79). Indeed, most of the tests that are used to evaluate potential analgesics rely on the measurement of evoked hypersensitivity (80). However, evoked withdrawal responses do not measure pain itself but rather the hypersensitivity (e.g.

allodynia) that often accompanies pain. Importantly, even if a significant number of neuropathic pain patients exhibits mechanical hypersensitivity (evoked pain), continuous or paroxysmal spontaneous (non-evoked) pain is more reflective of overall pain rating and is of much greater prevalence in people experiencing chronic pain (81). Finally, chronic pain has a negative impact on quality-of-life, leading to disturbed sleep and attention, anxiety, depression, and functional impairment. Therefore, assessment of well-being and functional rehabilitation should also be included in the screening process of analgesic drugs at the preclinical level. Accordingly, improved but more complex approaches have recently been proposed to measure pain and its impact, like conditioned place preference/aversion paradigms (53, 82-87, 88 ), rat grimace scale (89) or spontaneous innate behaviors (e.g. burrowing) (90, 91).

In the present study, we therefore examined the effects of NTS2 putative analgesics and actual prescribed drugs on different quality-of-life proxies in freely moving rats. For this purpose, we used a recently validated dynamic weight bearing device allowing the assessment of the time-of-use of the injured limb, weight load deficits, and compensatory shifts in weight distribution (47, 56). The results obtained with this behavioral device revealed that NTS2 agonists (with the exception of β-lactotensin) improved the time of ambulation spent on the injured paw and reversed the weight-bearing deficits induced by the peripheral neuropathy. Interestingly, our findings also demonstrate that both morphine and pregabalin, which were effective in reducing tactile allodynia were mostly inefficient in improving these quality-of-life parameters. Besides, amitriptyline displayed a mixed profile, allowing recovery of the injured paw utilization but having no effect on

neuropathy-induced weight-bearing deficits. The effects of amitriptyline on rehabilitation do not seem to be related to hyperlocomotion (92, 93). Furthermore, previous studies assessing the effects of analgesics on non-evoked pain behaviors, such as conditioned place preference/aversion tests (82, 86, 94), foot posture and weight load (95) revealed that opioid agonists were not effective in reversing pain-related behaviors. These results may, in part, explain why these analgesics do not provide adequate pain relief of continuous spontaneous (non-evoked) pain in neuropathic pain patients. They also reinforce the idea of assessing affective and health-related quality-of-life components rather than purely sensory component of pain. Thus, development of new painkillers and screening of existing compound libraries should always include outcome measures capturing the multi-dimensional nature of pain.

In conclusion, these results demonstrate for the first time that NTS2 agonists are able to modulate pain sensation in the context of neuropathic pain, relieving touch-evoked allodynia and improving quality-of-life proxies. Importantly, since NT mediates analgesia at least in part through opioid-independent mechanisms, these findings support the idea that NTS2 agonists represent an attractive alternative for treating painful neuropathies, while decreasing the side-effect charge of opioid medications. Alternatively, the development of concomitant therapy such as NTS2 agonists with existing reference drugs should rely on the gain of efficacy of each drug on both non-evoked pain and health-related quality-of-life components.

**ACKNOWLEDGEMENTS:**

This work is supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, MOP-74618) awarded to PS. PS is recipient of the Canada Research Chair in Neurophysiopharmacology of Chronic Pain, director of the Sherbrooke's Neuroscience Centre, and member of the FRQS-funded Centre de Recherche Clinique Étienne Lebel. PT holds a doctoral scholarship from the Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS).

**References**


1. Finnerup, N. B., Sindrup, S. H., and Jensen, T. S. (2010) The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. *Pain* 150, 573-581
2. Attal, N. (2012) Neuropathic pain: mechanisms, therapeutic approach, and interpretation of clinical trials. *Continuum (Minneap Minn)* 18, 161-175
3. de Leon-Casasola, O. (2011) New developments in the treatment algorithm for peripheral neuropathic pain. *Pain Med* 12 Suppl 3, S100-108
4. Dworkin, R. H., O'Connor, A. B., Audette, J., Baron, R., Gourlay, G. K., Haanpaa, M. L., Kent, J. L., Krane, E. J., Lebel, A. A., Levy, R. M., Mackey, S. C., Mayer, J., Miaskowski, C., Raja, S. N., Rice, A. S., Schmader, K. E., Stacey, B., Stanos, S., Treede, R. D., Turk, D. C., Walco, G. A., and Wells, C. D. (2010) Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. *Mayo Clin Proc* 85, S3-14
5. Goss, J. R., Goins, W. F., and Glorioso, J. C. (2007) Gene therapy applications for the treatment of neuropathic pain. *Expert Rev Neurother* 7, 487-506
6. Kennedy, J. D. (2007) Neuropathic pain: molecular complexity underlies continuing unmet medical need. *J Med Chem* 50, 2547-2556
7. Xu, B., Descalzi, G., Ye, H. R., Zhuo, M., and Wang, Y. W. (2012) Translational investigation and treatment of neuropathic pain. *Mol Pain* 8, 15
8. Benyamin, R., Trescot, A. M., Datta, S., Buenaventura, R., Adlaka, R., Sehgal, N., Glaser, S. E., and Vallejo, R. (2008) Opioid complications and side effects. *Pain Physician* 11, S105-120

9. Devulder, J., Richarz, U., and Nataraja, S. H. (2005) Impact of long-term use of opioids on quality of life in patients with chronic, non-malignant pain. *Curr Med Res Opin* 21, 1555-1568

10. Sullivan, M. D., and Ballantyne, J. C. (2012) What are we treating with long-term opioid therapy? *Arch Intern Med* 172, 433-434

11. de Leon-Casasola, O. A. (2013) Opioids for chronic pain: new evidence, new strategies, safe prescribing. *Am J Med* 126, S3-S11

12. Salon, J. A., Lodowski, D. T., and Palczewski, K. (2011) The significance of G protein-coupled receptor crystallography for drug discovery. *Pharmacol Rev* 63, 901-937

13. Stone, L. S., and Molliver, D. C. (2009) In search of analgesia: emerging poles of GPCRs in pain. *Mol Interv* 9, 234-251

14. Dobner, P. R. (2006) Neurotensin and pain modulation. *Peptides* 27, 2405-2414

15. Patrycja, P. K., and Lipkowski, A. W. (2013) Neurotensin and neurotensin receptors: characteristic, structure-activity relationship and pain modulation -A review. *Eur J Pharmacol*

16. Sarret, P., and Beaudet, A. (2003) Neurotensin receptors in the central nervous system. *Handbook of chemical neuroanatomy* Vol. 20. Peptide Receptors, Part II. Amsterdam: Elsevier, 323-400

17. Boules, M., Johnston, H., Tozy, J., Smith, K., Li, Z., and Richelson, E. (2011) Analgesic synergy of neurotensin receptor subtype 2 agonist NT79 and morphine. *Behav Pharmacol* 22, 573-581

18. Bredeloux, P., Cavelier, F., Dubuc, I., Vivet, B., Costentin, J., and Martinez, J. (2008) Synthesis and biological effects of c(Lys-Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu-Lys-Lys-Pro-

Tyr-Ile-Leu) (JMV2012), a new analogue of neurotensin that crosses the blood-brain barrier. *J Med Chem* 51, 1610-1616

19. Buhler, A. V., Choi, J., Proudfit, H. K., and Gebhart, G. F. (2005) Neurotensin activation of the NTR1 on spinally-projecting serotonergic neurons in the rostral ventromedial medulla is antinociceptive. *Pain* 114, 285-294

20. Buhler, A. V., Proudfit, H. K., and Gebhart, G. F. (2008) Neurotensin-produced antinociception in the rostral ventromedial medulla is partially mediated by spinal cord norepinephrine. *Pain* 135, 280-290

21. Guillemette, A., Dansereau, M. A., Beaudet, N., Richelson, E., and Sarret, P. (2012) Intrathecal administration of NTS1 agonists reverses nociceptive behaviors in a rat model of neuropathic pain. *Eur J Pain* 16, 473-484

22. Hughes, F. M., Jr., Shaner, B. E., May, L. A., Zotian, L., Brower, J. O., Woods, R. J., Cash, M., Morrow, D., Massa, F., Mazella, J., and Dix, T. A. (2010) Identification and functional characterization of a stable, centrally active derivative of the neurotensin (8-13) fragment as a potential first-in-class analgesic. *J Med Chem* 53, 4623-4632

23. Rossi, G. C., Matulonis, J. E., Richelson, E., Barbut, D., and Pasternak, G. W. (2010) Systemically and topically active antinociceptive neurotensin compounds. *J Pharmacol Exp Ther* 334, 1075-1079

24. Roussy, G., Dansereau, M. A., Baudisson, S., Ezzoubaa, F., Belleville, K., Beaudet, N., Martinez, J., Richelson, E., and Sarret, P. (2009) Evidence for a role of NTS2 receptors in the modulation of tonic pain sensitivity. *Mol Pain* 5, 38

25. Roussy, G., Dansereau, M. A., Dore-Savard, L., Belleville, K., Beaudet, N., Richelson, E., and Sarret, P. (2008) Spinal NTS1 receptors regulate nociceptive signaling in a rat formalin tonic pain model. *J Neurochem* 105, 1100-1114

26. Sarret, P., Esdaile, M. J., Perron, A., Martinez, J., Stroh, T., and Beaudet, A. (2005) Potent spinal analgesia elicited through stimulation of NTS2 neurotensin receptors. *J Neurosci* 25, 8188-8196

27. Smith, K. E., Boules, M., Williams, K., and Richelson, E. (2012) NTS1 and NTS2 mediate analgesia following neurotensin analog treatment in a mouse model for visceral pain. *Behav Brain Res* 232, 93-97

28. Dore-Savard, L., Roussy, G., Dansereau, M. A., Collingwood, M. A., Lennox, K. A., Rose, S. D., Beaudet, N., Behlke, M. A., and Sarret, P. (2008) Central delivery of Dicer-substrate siRNA: a direct application for pain research. *Mol Ther* 16, 1331-1339

29. Smith, D. J., Hawranko, A. A., Monroe, P. J., Gully, D., Urban, M. O., Craig, C. R., Smith, J. P., and Smith, D. L. (1997) Dose-dependent pain-facilitatory and -inhibitory actions of neurotensin are revealed by SR 48692, a nonpeptide neurotensin antagonist: influence on the antinociceptive effect of morphine. *J Pharmacol Exp Ther* 282, 899-908.

30. Dubuc, I., Sarret, P., Labbe-Jullie, C., Botto, J. M., Honore, E., Bourdel, E., Martinez, J., Costentin, J., Vincent, J. P., Kitabgi, P., and Mazella, J. (1999) Identification of the receptor subtype involved in the analgesic effect of neurotensin. *J Neurosci* 19, 503-510.

31. Maeno, H., Yamada, K., Santo-Yamada, Y., Aoki, K., Sun, Y. J., Sato, E., Fukushima, T., Ogura, H., Araki, T., Kamichi, S., Kimura, I., Yamano, M., Maeno-

Hikichi, Y., Watase, K., Aoki, S., Kiyama, H., Wada, E., and Wada, K. (2004) Comparison of mice deficient in the high- or low-affinity neurotensin receptors, Ntsr1 or Ntsr2, reveals a novel function for Ntsr2 in thermal nociception. *Brain Res* 998, 122-129

32. Pettibone, D. J., Hess, J. F., Hey, P. J., Jacobson, M. A., Leviten, M., Lis, E. V., Mallorga, P. J., Pascarella, D. M., Snyder, M. A., Williams, J. B., and Zeng, Z. (2002) The effects of deleting the mouse neurotensin receptor NTR1 on central and peripheral responses to neurotensin. *J Pharmacol Exp Ther* 300, 305-313.

33. Tyler, B. M., McCormick, D. J., Hoshall, C. V., Douglas, C. L., Jansen, K., Lacy, B. W., Cusack, B., and Richelson, E. (1998) Specific gene blockade shows that peptide nucleic acids readily enter neuronal cells in vivo. *FEBS Lett* 421, 280-284.

34. Mechanic, J. A., Sutton, J. E., Berson, A. E., Wu, X., Kwan, J., Schreiber, R., Pang, Z., and Button, D. C. (2009) Involvement of the neurotensin receptor 1 in the behavioral effects of two neurotensin agonists, NT-2 and NT69L: lack of hypothermic, antinociceptive and antipsychotic actions in receptor knockout mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 19, 466-475

35. Clineschmidt, B. V., and McGuffin, J. C. (1977) Neurotensin administered intracisternally inhibits responsiveness of mice to noxious stimuli. *Eur J Pharmacol* 46, 395-396.

36. Clineschmidt, B. V., McGuffin, J. C., and Bunting, P. B. (1979) Neurotensin: antinocisponsive action in rodents. *Eur J Pharmacol* 54, 129-139.

37. al-Rodhan, N. R., Richelson, E., Gilbert, J. A., McCormick, D. J., Kanba, K. S., Pfenning, M. A., Nelson, A., Larson, E. W., and Yaksh, T. L. (1991) Structure-

antinociceptive activity of neurotensin and some novel analogues in the periaqueductal gray region of the brainstem. *Brain Res* 557, 227-235.

38. Behbehani, M. M., and Pert, A. (1984) A mechanism for the analgesic effect of neurotensin as revealed by behavioral and electrophysiological techniques. *Brain Res* 324, 35-42.

39. Osbahr, A. J., 3rd, Nemeroff, C. B., Luttinger, D., Mason, G. A., and Prange, A. J., Jr. (1981) Neurotensin-induced antinociception in mice: antagonism by thyrotropin-releasing hormone. *J Pharmacol Exp Ther* 217, 645-651

40. Sarhan, S., Hitchcock, J. M., Grauffel, C. A., and Wettstein, J. G. (1997) Comparative antipsychotic profiles of neurotensin and a related systemically active peptide agonist. *Peptides* 18, 1223-1227.

41. Boules, M., Shaw, A., Liang, Y., Barbut, D., and Richelson, E. (2009) NT69L, a novel analgesic, shows synergy with morphine. *Brain Res* 1294, 22-28

42. Kleczkowska, P., Kosson, P., Ballet, S., Van den Eynde, I., Tsuda, Y., Tourwe, D., and Lipkowski, A. W. (2010) PK20, a new opioid-neurotensin hybrid peptide that exhibits central and peripheral antinociceptive effects. *Mol Pain* 6, 86

43. Todd, A. J. (2010) Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci* 11, 823-836

44. Ueda, H. (2006) Molecular mechanisms of neuropathic pain-phenotypic switch and initiation mechanisms. *Pharmacol Ther* 109, 57-77

45. Kuner, R. (2010) Central mechanisms of pathological pain. *Nat Med* 16, 1258-1266

46. Bennett, G. J., and Xie, Y. K. (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33, 87-107

47. Tetreault, P., Dansereau, M. A., Dore-Savard, L., Beaudet, N., and Sarret, P. (2011) Weight bearing evaluation in inflammatory, neuropathic and cancer chronic pain in freely moving rats. *Physiol Behav* 104, 495-502

48. Sarret, P., Perron, A., Stroh, T., and Beaudet, A. (2003) Immunohistochemical distribution of NTS2 neurotensin receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 461, 520-538

49. Sarret, P., Krzywkowski, P., Segal, L., Nielsen, M. S., Petersen, C. M., Mazella, J., Stroh, T., and Beaudet, A. (2003) Distribution of NTS3 receptor/sortilin mRNA and protein in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 461, 483-505

50. Honore, P., Rogers, S. D., Schwei, M. J., Salak-Johnson, J. L., Luger, N. M., Sabino, M. C., Clohisy, D. R., and Mantyh, P. W. (2000) Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons. *Neuroscience* 98, 585-598

51. Berrocoso, E., Mico, J. A., Vitton, O., Ladure, P., Newman-Tancredi, A., Depoortere, R., and Bardin, L. (2011) Evaluation of milnacipran, in comparison with amitriptyline, on cold and mechanical allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 655, 46-51

52. Kumar, N., Laferriere, A., Yu, J. S., Leavitt, A., and Coderre, T. J. (2010) Evidence that pregabalin reduces neuropathic pain by inhibiting the spinal release of glutamate. *J Neurochem* 113, 552-561

53. LaBuda, C. J., and Little, P. J. (2005) Pharmacological evaluation of the selective spinal nerve ligation model of neuropathic pain in the rat. *J Neurosci Methods* 144, 175-181

54. Mogil, J. S. (2009) Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci* 10, 283-294

55. Mao, J. (2012) Current challenges in translational pain research. *Trends Pharmacol Sci* 33, 568-573

56. Dore-Savard, L., Beaudet, N., Tremblay, L., Xiao, Y., Lepage, M., and Sarret, P. (2013) A micro-imaging study linking bone cancer pain with tumor growth and bone resorption in a rat model. *Clin Exp Metastasis* 30, 225-236

57. Overington, J. P., Al-Lazikani, B., and Hopkins, A. L. (2006) How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 5, 993-996

58. Perron, A., Sharif, N., Gendron, L., Lavallee, M., Stroh, T., Mazella, J., and Beaudet, A. (2006) Sustained neurotensin exposure promotes cell surface recruitment of NTS2 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 343, 799-808

59. Vachon, P., Masse, R., and Gibbs, B. F. (2004) Substance P and neurotensin are up-regulated in the lumbar spinal cord of animals with neuropathic pain. *Can J Vet Res* 68, 86-92.

60. Zhang, X., Bao, L., Xu, Z. Q., Diez, M., Frey, P., and Hokfelt, T. (1996) Peripheral axotomy induces increased expression of neurotensin in large neurons in rat lumbar dorsal root ganglia. *Neurosci Res* 25, 359-369.

61. Xiao, H. S., Huang, Q. H., Zhang, F. X., Bao, L., Lu, Y. J., Guo, C., Yang, L., Huang, W. J., Fu, G., Xu, S. H., Cheng, X. P., Yan, Q., Zhu, Z. D., Zhang, X., Chen, Z., and Han, Z. G. (2002) Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8360-8365.

62. Yang, L., Zhang, F. X., Huang, F., Lu, Y. J., Li, G. D., Bao, L., Xiao, H. S., and Zhang, X. (2004) Peripheral nerve injury induces trans-synaptic modification of channels, receptors and signal pathways in rat dorsal spinal cord. *European Journal of Neuroscience* 19, 871-883

63. LaCroix-Fralish, M. L., Austin, J. S., Zheng, F. Y., Levitin, D. J., and Mogil, J. S. (2011) Patterns of pain: meta-analysis of microarray studies of pain. *Pain* 152, 1888-1898

64. Jaggi, A. S., Jain, V., and Singh, N. (2009) Animal models of neuropathic pain. *Fundam Clin Pharmacol*

65. Wang, L. X., and Wang, Z. J. (2003) Animal and cellular models of chronic pain. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 949-965

66. De Vry, J., Kuhl, E., Franken-Kunkel, P., and Eckel, G. (2004) Pharmacological characterization of the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 491, 137-148

67. Dowdall, T., Robinson, I., and Meert, T. F. (2005) Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury. *Pharmacol Biochem Behav* 80, 93-108

68. Pradhan, A. A., Yu, X. H., and Laird, J. M. (2010) Modality of hyperalgesia tested, not type of nerve damage, predicts pharmacological sensitivity in rat models of neuropathic pain. *Eur J Pain* 14, 503-509

69. Gilron, I., Watson, C. P., Cahill, C. M., and Moulin, D. E. (2006) Neuropathic pain: a practical guide for the clinician. *CMAJ* 175, 265-275

70. Dubuc, I., Remande, S., and Costentin, J. (1999) The partial agonist properties of levocabastine in neurotensin-induced analgesia. *Eur J Pharmacol* 381, 9-12

71. Yamauchi, R., Sonoda, S., Jinsmaa, Y., and Yoshikawa, M. (2003) Antinociception induced by beta-lactotensin, a neurotensin agonist peptide derived from beta-lactoglobulin, is mediated by NT2 and D1 receptors. *Life Sci* 73, 1917-1923

72. Boules, M., Liang, Y., Briody, S., Miura, T., Fauq, I., Oliveros, A., Wilson, M., Khaniyev, S., Williams, K., Li, Z., Qi, Y., Katovich, M., and Richelson, E. (2010) NT79: A novel neurotensin analog with selective behavioral effects. *Brain Res* 1308, 35-46

73. Dubuc, I., Costentin, J., Doulut, S., Rodriguez, M., Martinez, J., and Kitabgi, P. (1992) JMV 449: a pseudopeptide analogue of neurotensin-(8-13) with highly potent and long-lasting hypothermic and analgesic effects in the mouse. *Eur J Pharmacol* 219, 327-329

74. Feifel, D., Goldenberg, J., Melendez, G., and Shilling, P. D. (2010) The acute and subchronic effects of a brain-penetrating, neurotensin-1 receptor agonist on feeding, body weight and temperature. *Neuropharmacology* 58, 195-198

75. Tyler-McMahon, B. M., Stewart, J. A., Farinas, F., McCormick, D. J., and Richelson, E. (2000) Highly potent neurotensin analog that causes hypothermia and antinociception. *Eur J Pharmacol* 390, 107-111

76. Kissin, I. (2010) The development of new analgesics over the past 50 years: a lack of real breakthrough drugs. *Anesth Analg* 110, 780-789

77. Apkarian, A. V., Baliki, M. N., and Geha, P. Y. (2009) Towards a theory of chronic pain. *Prog Neurobiol* 87, 81-97

78. Woolf, C. J. (2010) Overcoming obstacles to developing new analgesics. *Nat Med* 16, 1241-1247

79. Rice, A. S., Cimino-Brown, D., Eisenach, J. C., Kontinen, V. K., Lacroix-Fralish, M. L., Machin, I., Mogil, J. S., and Stohr, T. (2008) Animal models and the prediction of efficacy in clinical trials of analgesic drugs: a critical appraisal and call for uniform reporting standards. *Pain* 139, 243-247

80. Mogil, J. S., and Crager, S. E. (2004) What should we be measuring in behavioral studies of chronic pain in animals? *Pain* 112, 12-15

81. Backonja, M. M., and Stacey, B. (2004) Neuropathic pain symptoms relative to overall pain rating. *J Pain* 5, 491-497

82. Sufka, K. J. (1994) Conditioned place preference paradigm: a novel approach for analgesic drug assessment against chronic pain. *Pain* 58, 355-366

83. Davoody, L., Quiton, R. L., Lucas, J. M., Ji, Y., Keller, A., and Masri, R. (2011) Conditioned place preference reveals tonic pain in an animal model of central pain. *J Pain* 12, 868-874

84. Johansen, J. P., Fields, H. L., and Manning, B. H. (2001) The affective component of pain in rodents: direct evidence for a contribution of the anterior cingulate cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8077-8082

85. King, T., Vera-Portocarrero, L., Gutierrez, T., Vanderah, T. W., Dussor, G., Lai, J., Fields, H. L., and Porreca, F. (2009) Unmasking the tonic-aversive state in neuropathic pain. *Nat Neurosci* 12, 1364-1366

86. Ding, H. K., Shum, F. W., Ko, S. W., and Zhuo, M. (2005) A new assay of thermal-based avoidance test in freely moving mice. *J Pain* 6, 411-416

87. Baliki, M., Calvo, O., Chialvo, D. R., and Apkarian, A. V. (2005) Spared nerve injury rats exhibit thermal hyperalgesia on an automated operant dynamic thermal escape task. *Mol Pain* 1, 18

88. Mauderli, A. P., Acosta-Rua, A., and Vierck, C. J. (2000) An operant assay of thermal pain in conscious, unrestrained rats. *J Neurosci Methods* 97, 19-29

89. Sotocinal, S. G., Sorge, R. E., Zaloum, A., Tuttle, A. H., Martin, L. J., Wieskopf, J. S., Mapplebeck, J. C., Wei, P., Zhan, S., Zhang, S., McDougall, J. J., King, O. D., and Mogil, J. S. (2011) The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain* 7, 55

90. Jirkof, P., Cesarovic, N., Rettich, A., Nicholls, F., Seifert, B., and Arras, M. (2010) Burrowing behavior as an indicator of post-laparotomy pain in mice. *Front Behav Neurosci* 4, 165

91. Andrews, N., Legg, E., Lisak, D., Issop, Y., Richardson, D., Harper, S., Huang, W., Burgess, G., Machin, I., and Rice, A. S. (2011) Spontaneous burrowing behaviour in the rat is reduced by peripheral nerve injury or inflammation associated pain. *Eur J Pain*

92. Maj, J., Dziedzicka-Wasylewska, M., Rogoz, R., and Rogoz, Z. (1998) Effect of antidepressant drugs administered repeatedly on the dopamine D3 receptors in the rat brain. *Eur J Pharmacol* 351, 31-37

93. Brocco, M., Dekeyne, A., Veiga, S., Girardon, S., and Millan, M. J. (2002) Induction of hyperlocomotion in mice exposed to a novel environment by inhibition of serotonin reuptake. A pharmacological characterization of diverse classes of antidepressant agents. *Pharmacol Biochem Behav* 71, 667-680

94. Niikura, K., Narita, M., Nakamura, A., Okutsu, D., Ozeki, A., Kurahashi, K., Kobayashi, Y., Suzuki, M., and Suzuki, T. (2008) Direct evidence for the involvement of endogenous beta-endorphin in the suppression of the morphine-

induced rewarding effect under a neuropathic pain-like state. *Neurosci Lett* 435, 257-262

95. Angeby-Moller, K., Berge, O. G., and Hamers, F. P. (2008) Using the CatWalk method to assess weight-bearing and pain behaviour in walking rats with ankle joint monoarthritis induced by carrageenan: effects of morphine and rofecoxib. *J Neurosci Methods* 174, 1-9

# Discussion

***La gestion de la douleur : une lutte encore d'actualité?***

Le traitement des douleurs chroniques représente, encore aujourd'hui, un des grands défis de la médecine moderne. Les avancées médicales réalisées depuis les 50 dernières années sont impressionnantes : il est aujourd'hui possible de traiter des maladies qui semblaient incurables il y a quelques années à peine, alors que d'autres maladies ont même été virtuellement éradiquées de la surface de la planète. Malgré toutes ces avancées, la cause première de consultation médicale, symptôme ubiquitaire de la plupart des maladies, c'est-à-dire la douleur, persiste encore et tarde à connaître un remède vraiment efficace. Les cliniciens jonglent avec tout au plus une douzaine de molécules antalgiques ayant chacune leur lot d'effets secondaires et une efficacité limitée selon le type de douleur à traiter. Il va sans dire que son aspect multifactoriel rend la douleur extrêmement complexe à gérer efficacement. Ce constat fait toutefois de la douleur, et du domaine des neurosciences en général, un lieu de recherche très stimulant et passionnant.

L'amélioration du contrôle des douleurs neuropathique, mais également des douleurs chroniques en générales, passe par une meilleure compréhension globale de celles-ci. Afin d'approfondir nos connaissances, l'utilisation d'animaux, dans un contexte préclinique, reste toujours une étape cruciale et difficilement remplaçable. Cette réalité comporte par contre sa part de difficultés, dont la principale est, à mon avis, la translation des résultats de l'animal à l'humain. Comme il a été mentionné dans l'introduction, l'univers de la recherche sur la douleur se livre à une prise de conscience importante depuis plusieurs années à cause de l'absence de nouveaux composés analgésiques directement issus de la recherche animale. Cette observation est supportée par l'incapacité des molécules à faire efficacement le saut du préclinique au clinique, incapacité probablement due au problème de validité des études précliniques comme présenté dans la problématique de mes projets de doctorat. Un des exemples les plus marquants des dernières années est l'absence de résultats positifs chez l'humain avec des antagonistes du récepteur NK1 (Neurokinine 1, récepteur à la substance P) en comparaison aux excellents résultats précliniques obtenus en s'attaquant à ce même système (Blackburn-Munro 2004; Hill 2000;

Mantyh et al. 1997; Field et al. 2002; Rost, Fleischer, and Nieber 2006; Herbert and Holzer 2002).

***Le défi de l'évaluation préclinique de la douleur***

Bien qu'ayant des bagages génétiques très proches (environ 95 % des gènes humains sont partagés par le rat), plusieurs différences évolutives évidentes séparent l'Homme moderne du rat. Dans ce contexte, même s'il apparaît tentant de le faire, il est risqué de céder à l'anthropomorphisme face à une réponse comportementale murine, qui est fort probablement le résultat d'une réponse innée issue du système nerveux sympathique plutôt que d'une réponse réfléchie et rationnelle basée sur la compréhension de la condition pathologique. Des chercheurs se sont posés différentes questions sur ce sujet, entre autres: « À quel point les comportements associés à la douleur chez les animaux sont-ils humains? » (Mogil and Crager 2004; Blackburn-Munro 2004), ou encore : « Que devrait-on mesurer dans les études comportementales de douleur chronique chez les animaux? » (Villanueva 2000; Mogil and Crager 2004; Blackburn-Munro 2004). D'autres exemples similaires existent dans la littérature et tous vont dans la même direction ; les phénomènes d'hypersensibilité, comme l'allodynie et l'hyperalgésie, bien que présents dans la population atteinte de douleur chronique, ne sont probablement pas les bons types de comportements nociceptifs à évaluer chez les animaux (Vrinten and Hamers 2003; Villanueva 2000; Mogil et al. 2010; Blackburn-Munro 2004; Mogil and Crager 2004). La décision de faire progresser une molécule du préclinique vers le clinique, basée sur la diminution de ces phénomènes d'hypersensibilité, correspond à une vision réductionniste de ce qu'est la douleur chronique. Il apparaît alors essentiel d'intégrer l'évaluation de divers paramètres de qualité de vie, d'ordre sensorielle et/ou émotionnelle, dans la routine de criblage de nouveaux composés analgésiques dans le but d'incorporer l'analyse de sensations plus proches de la réalité clinique.

Ces différentes réflexions nous ont conduits à intégrer un nouvel appareillage dans notre batterie de tests comportementaux. Toutefois, avant d'utiliser le test de distribution pondérale dynamique (DWB, pour *Dynamic Weight Bearing*) pour tester l'efficacité de

composés analgésiques, il était essentiel de le caractériser afin de valider sa sensibilité à détecter des paramètres faisant partie de l'évaluation globale de la qualité de vie selon le questionnaire de qualité de vie de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Nous avons ainsi utilisé trois différents modèles animaux bien caractérisés dans la littérature, représentant les trois principaux types de douleur chronique, afin d'évaluer le développement de déficits comportementaux liés à la douleur chronique. Nous avons utilisé l'allodynie mécanique comme critère de référence puisqu'il a été démontré que ce signe était présent dans les trois types de douleur chronique. Conséquemment, le développement de douleur chronique menant à une diminution du poids mis sur la patte lésée était fortement corrélé au développement d'allodynie mécanique. Ces résultats concordaient avec différentes publications rapportant un parallèle entre l'allodynie et des problèmes d'utilisation de la patte blessée dans un contexte de douleur neuropathique (Doré-Savard et al. 2010; Vrinten and Hamers 2003; Mao-Ying et al. 2006; Mogil et al. 2010), cancéreuse (Combe, Bramwell, and Field 2004; Doré-Savard et al. 2010; Fernihough et al. 2004; Mao-Ying et al. 2006; Ferland et al. 2011) et inflammatoire (King et al. 2006; Combe, Bramwell, and Field 2004; Fernihough et al. 2004; Ferland et al. 2011). Notre but n'était cependant pas de vérifier si le DWB pouvait indirectement détecter l'allodynie, mais plutôt d'évaluer sa capacité à déceler des troubles comportementaux d'utilisations des membres lésés liés au développement de la douleur chronique.

En prenant en considération les analyses qu'il est possible d'obtenir avec le DWB, on constate alors que cet appareil est l'évolution logique du test d'incapacitance (ou SWB, pour Static Weight Bearing). En effet, ce dernier test ne permet d'évaluer que le poids posé sur les pattes arrières de l'animal. De plus, dans ce test, l'animal est dans une position contraignante qui nécessite de nombreuses périodes d'acclimatation. La méthode d'analyse couramment utilisée pour le SWB correspond à établir le ratio entre le poids appliqué sur chacune des deux pattes arrières (Hay et al. 1997; King et al. 2006). Comme nous l'avons mentionné dans notre article, cette approche biaise l'analyse en augmentant de façon mathématique l'effet réellement observé (Wilson et al. 2006; Hay et al. 1997). Ainsi, les études utilisant le SWB pour valider l'efficacité de composés analgésiques ont montré que la morphine améliorait le ratio des pattes arrières (Portenoy et al. 2010; Wilson et al. 2006).

Mais il est important de rappeler que les patients atteints de douleur chronique, qui reçoivent dans une grande proportion des traitements aux opioïdes, considèrent malgré tout leur condition comme mal gérée et rapporte une piètre qualité de vie (G. J. Bennett 2012; Portenoy et al. 2010; Mogil 2009; Mogil et al. 2010; Kawasaki-Yatsugi et al. 2012). La méthode que nous prônons avec l'utilisation du DWB rapporte le poids mis sur chacune des pattes sur le poids total de l'animal, donnant ainsi le pourcentage réel de l'utilisation des pattes et corrigeant la prise pondérale de l'animal au fil du temps. En plus d'avoir la répartition du poids sur toutes les pattes de l'animal, cette approche analytique procure un portrait global de la distribution pondérale de l'animal, permettant une comparaison approfondie des modifications présentes chez les animaux atteints de douleur chronique. Toujours dans l'optique d'approcher le plus possible de la réalité clinique, nous avons réussi à extraire de nos analyses un autre paramètre pertinent. Il s'agit du temps d'utilisation des pattes, correspondant au pourcentage de temps que l'animal dépose chacune de ses pattes au sol. Nous avons ainsi remarqué que les animaux atteints de douleur chronique, quelque soit le modèle, non seulement mettent moins de poids sur leur patte blessée, mais posent également moins souvent cette patte au sol. Selon différents auteurs, cette observation comportementale pourrait refléter un phénomène de douleur spontanée ou continue, phénomène douloureux très présent chez les patients, principalement chez ceux atteints de trouble d'ordre neuropathique (Mogil 2009; G. J. Bennett 2012; Mogil et al. 2010; Kawasaki-Yatsugi et al. 2012). Ce paramètre prédirait mieux l'évolution de la douleur et de la qualité de vie chez un patient que les états d'hypersensibilité qui peuvent être ou ne pas être présents chez ce même patient (Clineschmidt, Martin, and Veber 1982; Mogil 2009; J. Chrubasik, Chrubasik, and Martin 1993). Pour espérer faire son chemin du laboratoire jusqu'au patient tout en conservant son potentiel thérapeutique, les nouvelles molécules analgésiques devraient alors posséder le potentiel de moduler positivement ce dernier paramètre. Bien que le DWB possède des limitations évidentes de surface de déplacement et de résolution spatiale, la caractérisation du DWB que nous avons réalisée laisse croire que ce type d'appareil, et les générations successives qui utiliseront une technologie ou une approche similaires, offriront une façon relativement simple d'évaluer le potentiel analgésique de nouveaux composés.

***Agrandir la pharmacopée pour la gestion de la douleur neuropathique***

À l'instar de nombreuses pathologies, les douleurs chroniques n'ont malheureusement pas encore de traitement curatif. En attendant de percer les mystères de ces conditions pathologiques qui pourront mener à la guérison, nous devons continuer à chercher des alternatives aux antalgiques actuellement utilisés en clinique. Faisant souvent d'une pierre deux coups, la recherche de nouveaux traitements augmente notre connaissance du système nerveux et contribuera inévitablement à trouver d'éventuelles approches curatives. Une des thématiques du laboratoire du Pr Sarret porte sur de telles alternatives thérapeutiques. Le système neurotensinergique est l'un des systèmes ayant montré un potentiel intéressant de soulagement de la douleur, en plus de s'affranchir des voies opioïdergique pour induire ces effets analgésiques (Guillemette et al. 2012; Clineschmidt, Martin, and Veber 1982; J. Chrubasik, Chrubasik, and Martin 1993). Dans un article précédent issu du laboratoire, il a été montré que l'activation du récepteur NTS1 possédait la capacité de diminuer les réponses d'hypersensibilité réflexive dans un contexte de douleur neuropathique (Pettibone et al. 2002; Guillemette et al. 2012). Cependant, comme expliqué dans l'introduction, bien que l'activation de ce récepteur entraîne une analgésie, celle-ci est souvent liée à une hypothermie importante (Vachon, Massé, and Gibbs 2004; Pettibone et al. 2002; Zhang et al. 1996). C'est dans cette optique que nous avons voulu cibler le récepteur NTS2 pour nous affranchir de ces effets secondaires. Nous avons tout d'abord validé l'emplacement de ce récepteur chez des animaux sains, dans le système nerveux central (moelle épinière) et périphérique (DRG) au niveau régional, cellulaire et ultrastructural. À la lumière de ces résultats, force est de constater que le récepteur NTS2 est localisé dans des régions privilégiées pour avoir un rôle important dans la modulation nociceptive ascendante. En effet, sa localisation dans la *substantia gelatinosa*, région qui reçoit plusieurs terminaisons synaptiques provenant des fibres C et Aδ, suggère un rôle dans le contrôle de la transmission de l'influx nociceptif. De plus, dans ces mêmes régions, la microscopie électronique montre que le récepteur NTS2 est présent autant dans les dendrites que dans les terminaisons synaptiques, indiquant que ce récepteur pourrait être en mesure de jouer un rôle dans la modulation de la transmission de l'influx nociceptif au niveau pré- et post-synaptique.

Dans une réalité de douleur chronique neuropathique, nous avons cherché à savoir si le système neurotensinergique subissait des modifications d'expression dans les tissus nerveux d'intérêt. Il est intéressant de constater une fluctuation importante de ce système. L'analyse détaillée de ces résultats est présentée dans mon deuxième article. En résumé, nous observons une augmentation globale de l'expression de la NT, de façon bilatérale dans la moelle et ipsilatérale dans les DRG. À l'inverse, les récepteurs font face à une diminution, de façon bilatérale dans la moelle épinière et ipsilatéral dans les DRG, similaire aux zones où la NT voit son niveau être augmentée. Bien que cette dichotomie puisse paraître surprenante de prime abord, nos résultats vont dans la même direction que ce qui est présent dans la littérature quant à l'augmentation de NT (Xiao et al. 2002; Vachon, Massé, and Gibbs 2004; L. Yang et al. 2004; Zhang et al. 1996; Lacroix-Fralish et al. 2011) et la diminution des récepteurs (Sarret and Beaudet 2003; Xiao et al. 2002; L. Yang et al. 2004; Lacroix-Fralish et al. 2011). Suite à l'analyse de ces résultats, il est légitime de penser que durant la progression de la douleur neuropathique, les récepteurs subissent une sorte de désensibilisation menant à une baisse d'expression. Dans ce contexte, une thérapie visant à bloquer cette diminution pourrait avoir un potentiel analgésique intéressant. De plus, il est important de mentionner que la fluctuation que l'on observe n'est probablement pas due à une variation intrinsèque aux animaux. D'une part parce que les animaux contrôles ont été utilisés comme valeur de références, mais aussi parce que l'évolution temporelle de la présence des récepteurs à la NT chez le rat se stabilise, du moins dans le cerveau, à partir d'environ 30 jours de vie (figure 23). Les animaux utilisés dans le cadre de nos expériences entrent dans le protocole de douleur neuropathique lorsqu'ils ont environ 60 jours, minimisant l'impact que le développement pourrait avoir sur l'expression des récepteurs.

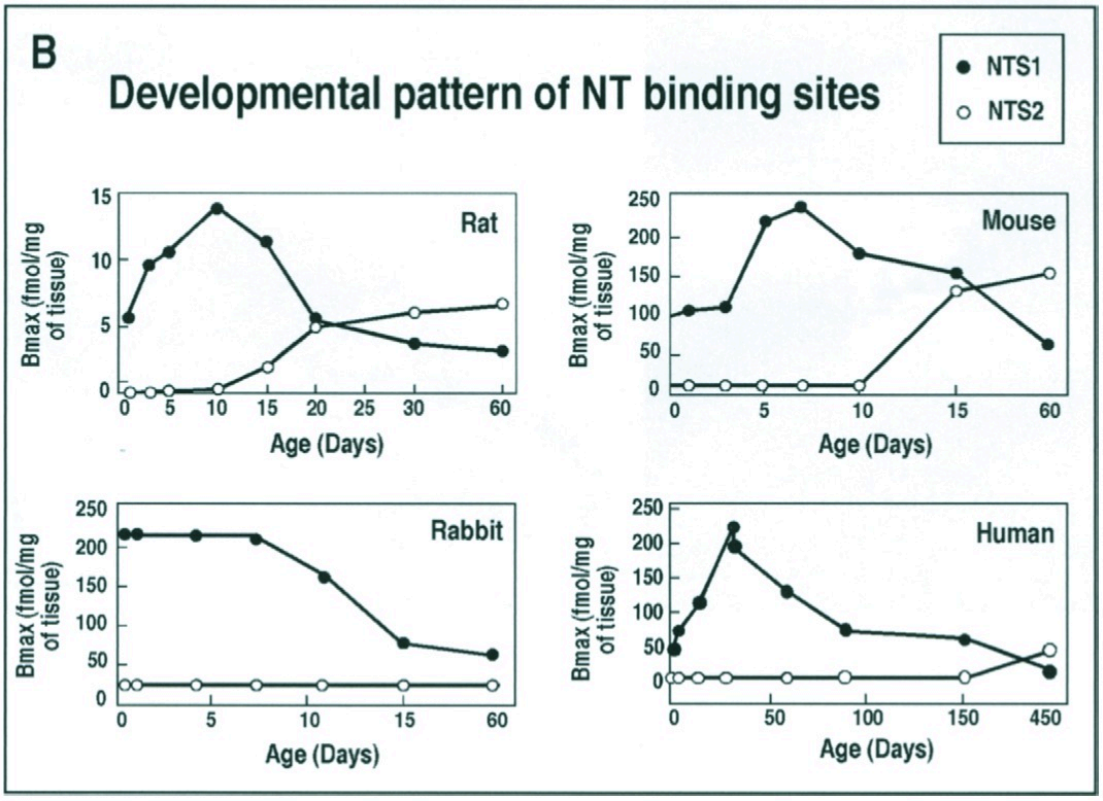



**Figure 23. Patron développemental de la quantité relative de récepteurs NTS1 et NTS2 dans les cerveaux de rats, souris, lapins et d'Hommes.**
Tiré de (Sarret et al. 2005; Sarret and Beaudet 2003; Roussy et al. 2009; Dubuc et al. 1999)

Malgré cette baisse d'expression d'ARNm des récepteurs, nous avons quand même tenté de voir si l'ajout exogène de ligand du récepteur NTS2 pouvait mener à une réponse analgésique. Comme il s'était montré efficace dans des modèles de douleur aiguë et tonique (Buhler, Proudfit, and Gebhart 2008; Sarret et al. 2005; Roussy et al. 2009; Yamauchi et al. 2003; Dubuc et al. 1999; Dubuc, Remande, and Costentin 1999), le JMV431 a été choisi comme agoniste du récepteur NTS2. De façon comparable, l'administration spinale de cet agoniste a été en mesure de réduire considérablement l'allodynie mécanique observée chez les animaux neuropathiques. Afin de valider ces résultats, d'autres agonistes connus du récepteur NTS2, comme la lévocabastine et la β-lactotensine (De Vry et al. 2004; Buhler, Proudfit, and Gebhart 2008; Dowdall, Robinson, and Meert 2005; Sarret et al. 2005; Pradhan, Yu, and Laird 2010; Yamauchi et al. 2003; Dubuc, Remande, and Costentin 1999), ont été utilisés. Ces molécules ont également montré une diminution intéressante de l'allodynie mécanique présente chez les rats ayant subi une lésion nerveuse. Nous avons

ainsi montré que le recrutement du récepteur NTS2, de façon comparable à ce qui a été montré pour NTS1, est en mesure d'induire une analgésie importante dans un contexte d'hypersensibilité.

Le modèle de douleur neuropathique utilisé au laboratoire a été bien caractérisé d'un point de vue pharmacologique (Goss, Goins, and Glorioso 2007; De Vry et al. 2004; Kennedy 2007; Dowdall, Robinson, and Meert 2005; Pradhan, Yu, and Laird 2010). De façon conséquente, nous avons montré que la morphine, l'amitriptyline et la prégabaline, des composés actuellement utilisés en première et deuxième lignes de traitement des douleurs neuropathiques, se sont avérés efficaces pour réduire l'allodynie mécanique. Toutefois, au vu des problèmes de soulagement rapportés par de nombreux patients (Sufka 1994; Goss, Goins, and Glorioso 2007; He et al. 2012; Kennedy 2007; Johansen, Fields, and Manning 2001; King et al. 2009; Davoody et al. 2011; Ding et al. 2005; Baliki et al. 2005; Mauderli, Acosta-Rua, and Vierck 2000), il apparaît alors évident que l'allodynie mécanique est loin d'être la seule composante à prendre en considération pour l'établissement de l'efficacité analgésique. Comme mentionné dans la première partie de la discussion, la caractérisation du DWB était une étape essentielle pour évaluer la capacité de cet appareil à déceler des composantes plus fines de la douleur chronique. L'étape suivante était alors de vérifier si ce nouveau test comportemental était sensible à des composés antalgiques. En nous intéressant principalement à trois paramètres qu'il est possible d'obtenir avec le DWB, soit la réhabilitation (% de restauration du temps d'utilisation des pattes), le retour de charge (% de restauration du poids mis sur la patte ipsilatérale) et le renversement de la compensation (% de retour du poids ayant été déplacé sur les pattes avant et controlatérale), nous avons été en mesure de cribler l'efficacité des agonistes du récepteur NTS2 ainsi que des traitements de première et deuxième lignes. Ces paramètres ont été déterminés en fonction de notre étude préliminaire puisqu'ils peuvent s'apparenter à certaines composantes de la qualité de vie observées chez l'humain telles que définies par l'OMS. En évaluant ces paramètres, nous avons montré que le JMV431 et la lévocabastine, contrairement à la β-lactotensine, étaient capables d'améliorer de façon significative la presque totalité de ces comportements. Il est intéressant de constater que, de tous les composés actuellement prescrits pour traiter la douleur chronique, seule l'amitriptyline a

montré une certaine efficacité en réussissant à améliorer un seul paramètre, celui de la réhabilitation. Les autres traitements, à des doses qui s'étaient montrées efficaces pour diminuer l'allodynie mécanique, n'ont pas été en mesure d'améliorer les différents paramètres de qualité de vie étudiés.

Notre étude tend ainsi vers la même direction que plusieurs autres groupes de recherche qui s'affairent à trouver des approches alternatives à l'évaluation préclinique de la douleur, toujours dans l'optique de s'approcher plus près d'une analyse des composantes affectant la qualité de vie des patients atteints de douleur chronique. En effet, des groupes ont développé des techniques mesurant le bien-être et le rétablissement fonctionnel des animaux liés à différents modèles de douleur chronique et les comorbidités qui peuvent y être associées. Des tests de placement préférentiel conditionné et d'évitement de conditions aversives (Sotocinal et al. 2011; Sufka 1994; He et al. 2012; Johansen, Fields, and Manning 2001; King et al. 2009; Davoody et al. 2011; Ding et al. 2005; Baliki et al. 2005; Mauderli, Acosta-Rua, and Vierck 2000), d'analyse d'expression faciale murine (Jirkof et al. 2010; Sotocinal et al. 2011; Andrews et al. 2011; Andrews et al. 2012) ou encore de comportements innés spontanés comme le fait de creuser dans du gravier (Roussy et al. 2008; Jirkof et al. 2010; Roussy et al. 2009; Andrews et al. 2011; Guillemette et al. 2012; Andrews et al. 2012; Tétreault et al. 2013; Sarret et al. 2005) se sont avérés d'un intérêt évident pour pallier aux lacunes rencontrées avec les tests d'évaluation classique basés sur un réflexe. C'est dans cette optique que nos résultats, montrant une inefficacité des traitements actuels pour améliorer des composantes sensorielles de la qualité de vie proches d'une réalité clinique, pourraient en partie expliquer la déception de plusieurs patients face à leur médication qui ne les soulage pas de façon optimale. Cette absence de soulagement affecte alors grandement la qualité de vie des patients, qui connaîtront un risque plus grand de développer des problèmes secondaires à leur douleur comme les troubles de sommeil et d'attention, de l'anxiété pouvant mener à la dépression et des déficits fonctionnels les empêchant de travailler ou de réaliser leurs activités quotidiennes. Toutes ces composantes biopsychosociales sont évidemment d'une importance primordiale lorsqu'il est question de qualité de vie et nous n'avons pas de résultats montrant que les agonistes neurotensinergique pourraient améliorer ces paramètres.

***Développer et caractériser des agonistes neurotensinergique de seconde génération***

Le système neurotensinergique s'installe progressivement parmi les cibles de choix dans le développement de nouvelles molécules analgésiques. Qu'ils soient utilisés seuls (Boules et al. 2009; Roussy et al. 2008; Boules et al. 2011; Roussy et al. 2009; Kleczkowska et al. 2010; Guillemette et al. 2012; Tétreault et al. 2013; Sarret et al. 2005), ou en combinaison avec d'autres antalgiques (Rivier et al. 1977; Boules et al. 2009; Bredeloux et al. 2008; Boules et al. 2011; Kokko et al. 2005; Kleczkowska et al. 2010; G. C. Rossi et al. 2010), les agonistes activant ce système possèdent le potentiel d'induire une analgésie importante tant en douleur aiguë, que tonique et chronique. Depuis les premières années de sa découverte, la NT a été modifiée afin d'améliorer l'ensemble de ses propriétés (Boules et al. 2013; Rivier et al. 1977; Boules et al. 2003; Bredeloux et al. 2008; K. E. Smith et al. 2011; Kokko et al. 2005; G. C. Rossi et al. 2010). Notre laboratoire de recherche n'est pas en reste dans cette approche et c'est pourquoi nous collaborons étroitement avec plusieurs groupes de recherche œuvrant dans le domaine de la chimie médicinale. L'une de ces collaborations a mené au développement de l'agoniste JMV2009, qui possède une modification chimique en position 10, mais qui conserve, malgré tout, la capacité de lier les deux RCPG de la neurotensine avec une forte affinité (Ki de 17,5 nM pour NTS1 et Ki de 5 nM pour NTS2). Je décrirai rapidement les principaux résultats obtenus avec cet agoniste avant d'expliquer de quelle façon il se classe dans une nouvelle génération de molécules ciblant le système neurotensinergique.

Les premières études effectuées avec cet agoniste ont montré une analgésie intéressante pouvant atteindre près de 60% de l'effet maximal possible au test de douleur aiguë de retrait de la queue dans un bain d'eau chaude (figure 24).

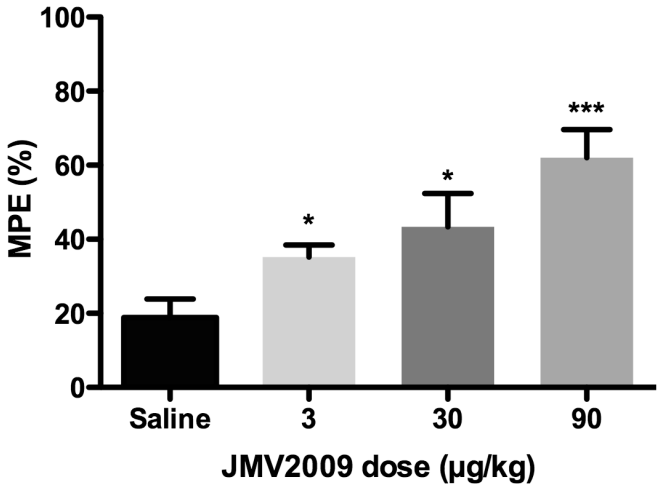



**Figure 24. Efficacité analgésique du JMV2009 en condition de douleur aiguë.** Évaluation de l'effet maximal possible (MPE pour « Maximal Possible Effect ») dans le test du retrait de la queue 40 minutes après l'injection intrathécale de JMV2009. Le pourcentage est calculé avec une valeur plafond de 10 secondes suivant la formule suivante : % MPE = [(latence JMV2009) – (latence de base)] / [(valeur plafond) – (latence de base)] x 100. * = $p<0,05$ *** = $p<0,001$. n = 5 à 12. Résultats de Pascal Tétreault, non publiés.

Ces résultats encourageants nous ont incités à continuer l'analyse de ce composé dans différents types de douleurs, toujours dans l'optique trouver des molécules qui aurait un potentiel de diminuer les douleurs chroniques. Avec l'aide de nos collaborateurs français, nous avons ainsi validé l'efficacité de ce composé pour diminuer les signes de douleur tonique. Les injections intrathécales et intra-cérébroventriculaires du JMV2009 ont été en mesure de réduire de façon importante la douleur observée dans la phase inflammatoire du test à la formaline (figure 25) et de diminuer de façon significative le nombre de crampes dans le test de douleur viscérale (figure 26).

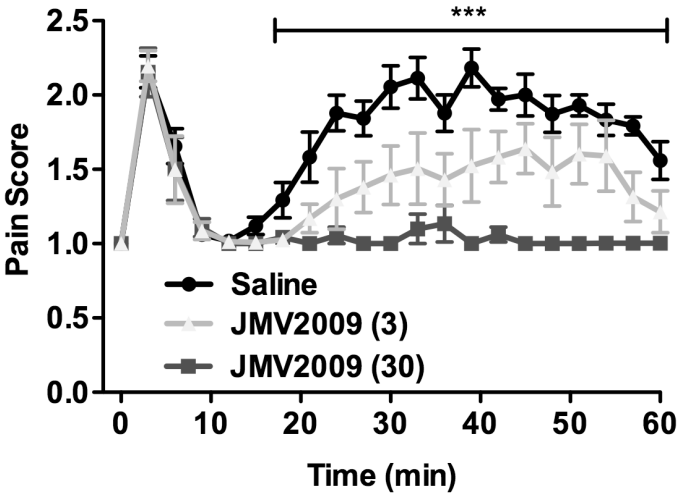



**Figure 25. Efficacité analgésique du JMV2009 en condition de douleur tonique.** Évaluation sur une période de 60 minutes de la réduction des comportements douloureux dans le test à la formaline après l'injection intrathécale de JMV2009. L'analyse statistique est réalisée sur l'ensemble de la phase inflammatoire (21 à 60 minutes) et la différence est significative aux deux doses utilisées. *** = p<0,001. n = 6 à 11. Résultats de Pascal Tétreault, non publiés.

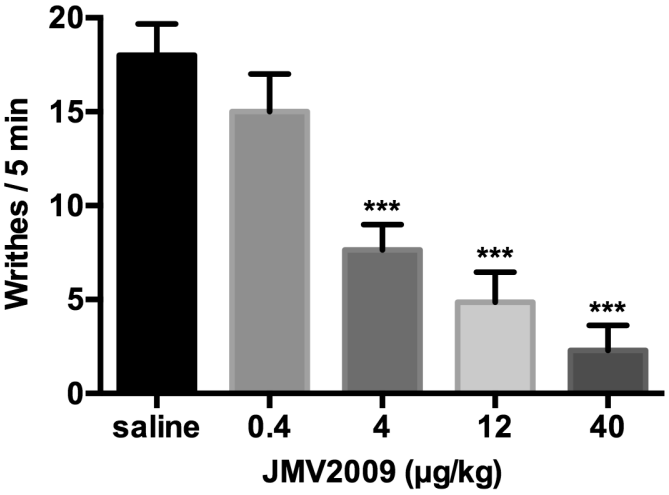



**Figure 26. Efficacité analgésique du JMV2009 en condition de douleur viscérale.** Évaluation de la réduction du nombre de crampes abdominales (*writhes*) suite à l'injection intrapéritonéale d'acide acétique et après l'injection intracérébroventriculaire de JMV2009 chez la souris. *** = p<0,001. n = 6 à 14. Résultats de l'équipe de Isabelle Dubuc, Université de Rouen.

L'abolition presque complète des signes de douleur tonique à des doses relativement faibles est un phénomène rarement observé dans notre laboratoire. Encouragés par ces résultats des plus intéressants, nous avons effectué des expériences dans le modèle de douleur neuropathique chronique utilisé précédemment. En utilisant les mêmes types d'analyse que nous avons développés dans les articles préalablement publiés, nous avons évalué la capacité du JMV2009 à modifier positivement les signes de douleur neuropathique, qu'ils soient induits par un stimulus externe (von Frey, figure 27) ou induit par l'activité normale de l'animal (DWB, figure 28).

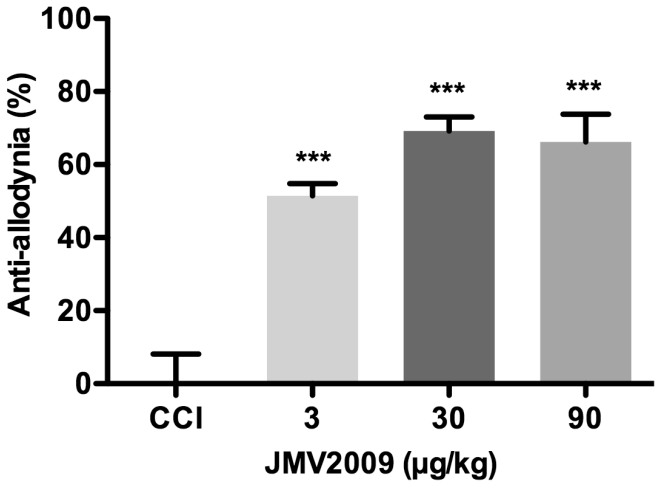



**Figure 27. Efficacité analgésique du JMV2009 à moduler l'allodynie mécanique en condition de douleur chronique neuropathique.**
Évaluation de l'effet anti-allodynique du JMV2009 sur des animaux souffrant de douleur neuropathique. Le pourcentage d'anti-allodynie est calculé en utilisant l'aire sous la courbe des jours 3 à 28 post-chirurgie avec la formule suivante : [(NP avec JMV2009) – (NP sans JMV2009)] / [(animaux Sham) – (NP sans JMV2009)] x 100. *** = p<0,001. n = 5 à 15. Résultats de Pascal Tétreault, non publiés.

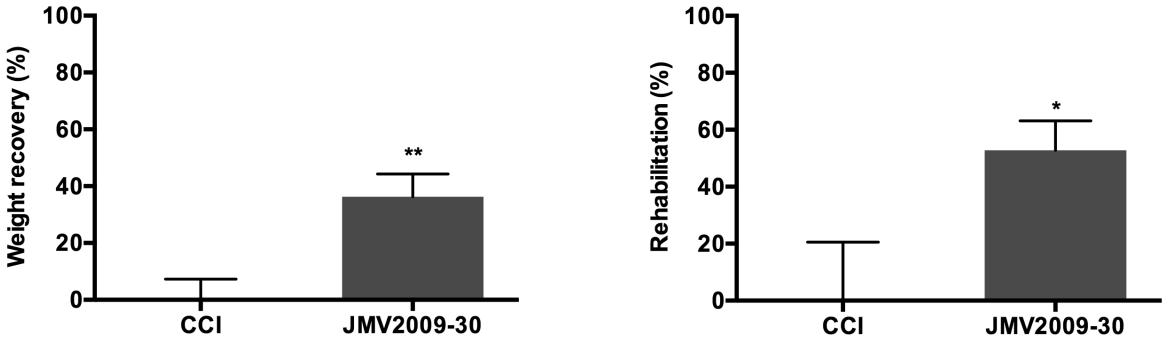



**Figure 28. Efficacité du JMV2009 à moduler certains paramètres de qualité de vie observés dans un modèle de douleur chronique neuropathique.**
Évaluation de l'amélioration du retour de poids (*weight recovery*) et du temps d'utilisation (*rehabilitation*) de la patte blessée après l'injection intrathécale de JMV2009. Le pourcentage d'amélioration est calculé en utilisant l'aire sous la courbe des jours 3 à 28 post-chirurgie avec la formule suivante : [(NP avec JMV2009) – (NP sans JMV2009)] / [(animaux Sham) – (NP sans JMV2009)] x 100. * = $p<0,05$, ** = $p<0,005$. n = 8 à 15. Résultats de Pascal Tétreault, non publiés.

Comme ce composé lie les récepteurs NTS1 et NTS2, il était important de vérifier la présence de l'effet secondaire principal normalement obtenu suite à l'activation de NTS1. L'effet hypothermique a donc été évalué suite à l'injection intrathécale de doses croissantes de JMV2009. Dans ce contexte, une absence d'hypothermie a été observée avec les trois doses testées (figure 29). Il est également connu qu'une tolérance aux effets hypothermique et analgésique peut se développer suite à une injection répétée de NT69L, un agoniste ciblant, comme le JMV2009, les récepteurs NTS1 et NTS2 (K. E. Smith et al. 2011; Boules et al. 2013; Boules et al. 2003). À l'aide de souris KO pour le récepteur NTS2, le groupe de Richelson a de plus montré que ce récepteur était nécessaire pour le développement de la tolérance hypothermique et analgésique (K. E. Smith et al. 2012; K. E. Smith et al. 2011; Hughes et al. 2010). Toutefois, dans un protocole similaire pour tester la tolérance, nous avons montré que le JMV2009 n'induisait pas de tolérance aux effets analgésiques obtenus au test du retrait de la queue (figure 30). Ce résultat concorde avec ceux obtenus par d'autre groupe qui ont également montré que l'injection répétée de certains agonistes, comme le NT79 qui cible le récepteur NTS2 uniquement ou le ABS212, qui cible NTS1 et NTS2, n'induit pas de tolérance aux effets analgésiques de ces composés (Feifel et al. 1999; K. E.

Smith et al. 2012; Dubuc et al. 1992; Hughes et al. 2010; Schotte, Leysen, and Laduron 1986; Kitabgi et al. 1987).

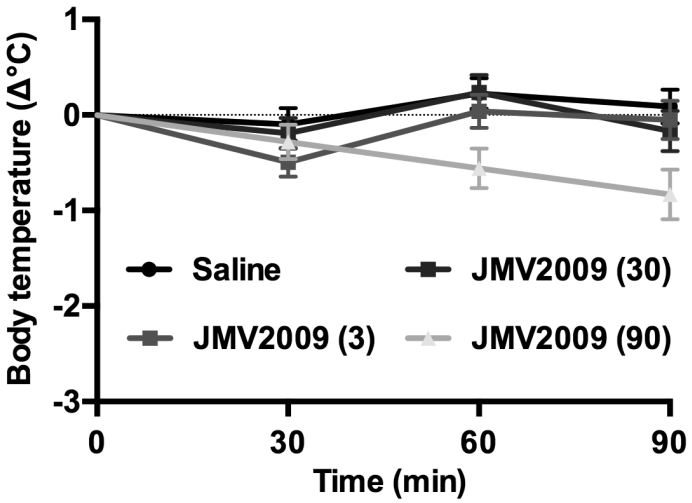



**Figure 29. Effet du JMV2009 sur la régulation de la température corporelle.** Évaluation de la variation de la température corporelle (*body temperature)* jusqu'à 90 minutes suivant l'injection intrathécale de JMV2009. Aucune différence significative n'est observée entre les différentes courbes. n = 5 à 12. Résultats de Pascal Tétreault, non publiés.

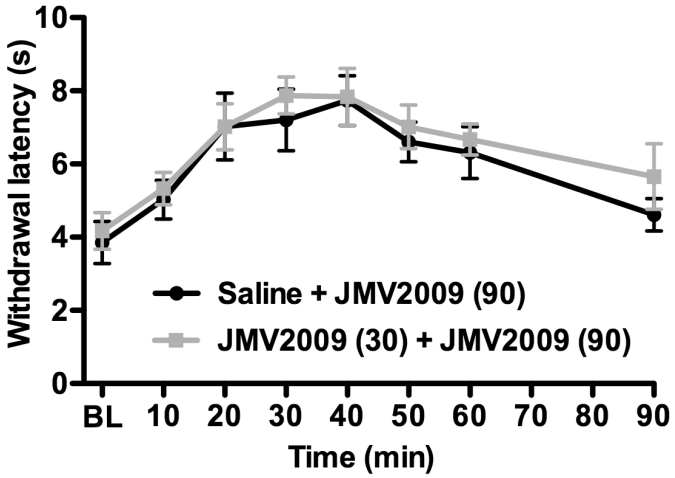


**Figure 30. Effet du JMV2009 sur le développement du phénomène de tolérance analgésique.**
Évaluation de la présence de tolérance à l'effet analgésique dans le test de retrait de la queue suite à un protocole d'injections répétées de JMV2009 (cinq injections de JMV2009, ou de saline, une fois par jour sur cinq jours, suivi d'une 6$^{e}$ injection le jour du test). Aucune différence significative n'est observée entre les deux courbes. n = 7 à 12. Résultats de Pascal Tétreault, non publiés.

Nous avons finalement caractérisé le JMV2009 d'un point de vue moléculaire afin d'évaluer quelles voies de signalisation intracellulaire sont activées suite à sa liaison avec les récepteurs NTS1/2 (résultats non montrés). En analysant les voies des MAPK, des β-arrestines, de l'AMPc, des protéines G et finalement l'internalisation des récepteurs, nous avons tout d'abord remarqué que cet agoniste est en mesure d'activer les voies de signalisation classique suite à la liaison de la NT sur ses récepteurs. Toutefois, les résultats obtenus sur le recrutement des β-arrestines et l'activation des protéines Gq laissent supposer que le JMV2009 pourrait être un agoniste biaisé, en favorisant la voie des β-arrestines par rapport à celle des protéines G. Cette dichotomie entre le JMV2009 et la NT pourrait expliquer l'absence d'hypothermie observée malgré l'activation par cet agoniste du récepteur NTS1. Des analyses plus poussées seront nécessaires afin de confirmer ces observations préliminaires.

À la lumière des résultats obtenus avec le JMV2009, il apparaît possible de classer les molécules ciblant le système neurotensinergique en deux générations. D'un côté, nous retrouvons la première génération d'agonistes et d'antagonistes qui ont été découverts et développés principalement pour comprendre le rôle des différents récepteurs du système. On retrouve ainsi le PD149163, agoniste du récepteur NTS1, la lévocabastine, agoniste du récepteur NTS2 à de faibles doses et le JMV449 agoniste de NTS1 et NTS2, pour ne nommer que ces trois exemples (Dubuc et al. 1994; Feifel et al. 1999; Vincent, Mazella, and Kitabgi 1999; Dubuc et al. 1992; Schotte, Leysen, and Laduron 1986; Kitabgi et al. 1987). Peu d'antagonistes sont décrits dans la littérature, mais on en retrouve principalement deux, de type non peptidique, soit le SR48692, sélectif du récepteur NTS1 et son successeur, le SR142948A, non sélectif et capable de bloquer les deux RCPG de la NT (Bredeloux et al. 2008; Dubuc et al. 1994; Vincent, Mazella, and Kitabgi 1999). Dans ce qu'on pourrait appeler la deuxième génération d'agonistes, on pourrait classer les

molécules ayant été développé pour démontrer des propriétés particulières comme une plus grande stabilité plasmatique (ex. : JMV2009), une affinité sous la barre des nanomolaires (ex. : JMV2007), une augmentation de la possibilité du passage de la BHE (ex. : JMV2012 (Patrycja and Lipkowski 2013; Bredeloux et al. 2008)), etc. Plusieurs de ces composés sont présentement étudiés au laboratoire et n'ont pas encore fait l'objet de publication. En ce qui a trait aux antagonistes, aucun ne semble en cours de développement, malgré qu'il n'existe pas encore d'antagoniste sélectif pour le récepteur NTS2.

Comme mentionné dans la conclusion d'une revue récente, les résultats déjà présents dans la littérature donnent de l'espoir pour développer de nouvelles générations d'analgésiques qui exploiteront les récepteurs à la NT connue pour être impliquée dans la modulation centrale de la douleur (Fire et al. 1998; Patrycja and Lipkowski 2013). L'article qui sera publié sous peu portant sur la caractérisation moléculaire et comportementale du JMV2009 s'insère ainsi parfaitement dans cette seconde vague de molécules ciblant le système neurotensinergique. En effet, les mécanismes et le fonctionnement global de ce système étant de mieux en mieux connus, le but recherché par nos articles tend davantage vers l'aspect thérapeutique que vers la compréhension fondamentale de la neurotensine et de ses récepteurs.

***Une approche non pharmacologique pour s'attaquer à la douleur***

Le dernier projet que je voulais aborder dans ma thèse représente une alternative prometteuse aux approches pharmacologiques présentées dans les pages précédentes. En effet, durant mon doctorat, je me suis intéressé à l'interférence de l'ARN comme façon de moduler l'activité du système neurotensinergique. Depuis la découverte de cette nouvelle technologie en 1998 par Andrew Fire et Craig Mello (Sah 2006; Fire et al. 1998; Bumcrot et al. 2006; Grimm and Kay 2007; Grimm 2009; Doré-Savard et al. 2008; Merkel et al. 2009; Kurreck 2009; Röhl and Kurreck 2006; Castanotto and Rossi 2009; S. Genc, Koroglu, and Genc 2004), qui leur a valu le prix Nobel de médecine en 2006, la compréhension et le raffinement de cette technique de thérapie génique ont grandement évolué. Depuis une dizaine d'années, le milieu scientifique s'intéresse de plus en plus à

cette approche pour son potentiel thérapeutique dans un grand nombre de pathologies, incluant plusieurs désordres neurologiques (Kaiser et al. 2010; Sah 2006; Bumcrot et al. 2006; Grimm and Kay 2007; Grimm 2009; Doré-Savard et al. 2008; Merkel et al. 2009; Kurreck 2009; Röhl and Kurreck 2006; Castanotto and Rossi 2009; S. Genc, Koroglu, and Genc 2004). Grâce à ces recherches, plusieurs études cliniques sont aujourd'hui en mesure d'utiliser cette approche dans une perspective de traitement : en date du 10 septembre 2013, on dénote ainsi 57 études sur le site *clinicaltrials.gov* avec les termes de recherche « RNA interference ». Certaines maladies comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge bénéficient déjà de traitement expérimental utilisant l'interférence de l'ARN (Ichim et al. 2004; Kaiser et al. 2010; Goyal et al. 2009; López-Fraga, Martínez, and Jiménez 2009; Sarret et al. 2011).

Différentes méthodes d'interférence de l'ARN (H.-K. Kim et al. 2010; Ichim et al. 2004; P. Kumar et al. 2007; Goyal et al. 2009; Mahato 2005; López-Fraga, Martínez, and Jiménez 2009; Neu, Fischer, and Kissel 2005; Sarret et al. 2011; S. K. Lee et al. 2012; S. K. Singh and Hajeri 2009) combinées à différents agents de transfection (Olejniczak, Galka, and Krzyzosiak 2010; H.-K. Kim et al. 2010; Scaggiante et al. 2011; P. Kumar et al. 2007; Behlke 2008; Mahato 2005; Behlke 2006; Neu, Fischer, and Kissel 2005; S. K. Lee et al. 2012; S. K. Singh and Hajeri 2009) ont été développées au fil du temps afin d'optimiser leur efficacité et minimiser la présence d'effets secondaires et d'effets hors cible (Doré-Savard et al. 2008; Olejniczak, Galka, and Krzyzosiak 2010; Sarret et al. 2010; Scaggiante et al. 2011; Sarret et al. 2011; Behlke 2008; Tétreault, Beaudet, and Sarret 2011; Behlke 2006; Sarret, Doré-Savard, and Beaudet 2010). Au laboratoire, nous avons l'opportunité depuis plusieurs années de collaborer avec l'équipe de recherche et développement de l'une des compagnies les plus importantes dans tout ce qui a trait à l'ADN et l'ARN. En effet, *Integrated DNA Technologies* (IDT) est reconnue mondialement pour sa grande production d'oligonucléotides de tout genre pouvant être utilisés dans de nombreuses applications. Cette collaboration a mené à ce jour à la publication d'un article, de trois chapitres de livre dont deux où je suis coauteur et un *proceeding* de congrès dont je suis premier auteur (présenté en annexe) (Rose et al. 2005; Doré-Savard et al. 2008; Collingwood et al. 2008; Sarret et al. 2010; Sarret et al. 2011; Tétreault, Beaudet, and Sarret 2011; Sarret, Doré-

Savard, and Beaudet 2010). Dans nos expériences, nous utilisons une nouvelle génération de molécules d'interférence de l'ARN développée par l'équipe de R&D de IDT, appelé DsiRNA (pour Dicer-substrate small interfering RNA) (Sarret et al. 2011; Rose et al. 2005; Collingwood et al. 2008). Comme présenté à la figure 31, les DsiRNA, tout comme les siRNA de premières générations, passent par une voie dite exogène, en opposition au mécanisme endogène faisant intervenir les micro-RNA.

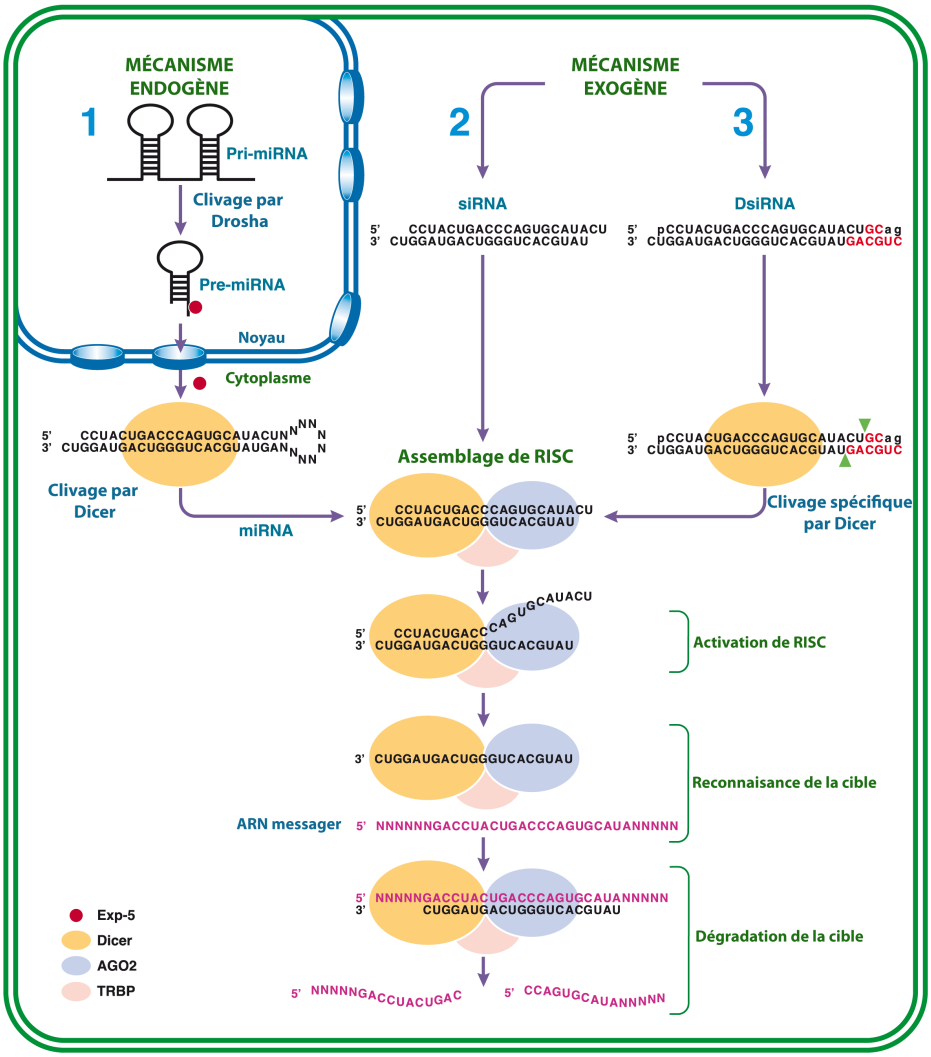
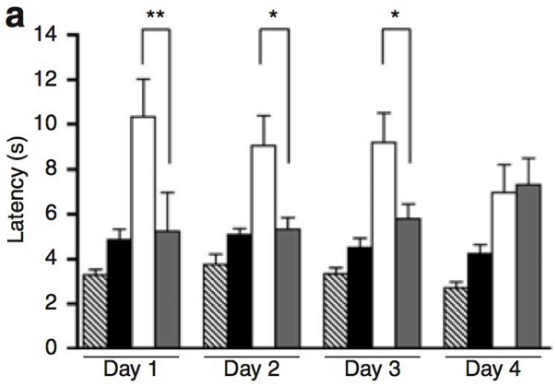



**Figure 31. Résumé des mécanismes endogènes et exogènes menant à l'interférence de l'ARN.**
Illustration montrant les différentes voies possibles que peuvent prendre les molécules d'interférence de l'ARN afin d'induire une dégradation de l'ARNm cible par le complexe

multimoléculaire RISC (pour *RNA Induced Silencing Complex)*. Tirée et traduite de (Amarzguioui et al. 2006; Sarret et al. 2011; Amarzguioui and Rossi 2008).

Tel qu'illustré dans la figure précédente, un des avantages principaux des DsiRNA par rapport aux siRNA est l'étape supplémentaire de clivage spécifique par la protéine Dicer, qui assure une intégration optimale de la molécule d'interférence de l'ARN dans le complexe RISC. Afin de s'assurer de cette étape de clivage par Dicer, différentes modifications chimiques et des ajouts de nucléotides spécifiques ont été réalisés sur le squelette des siRNA (D.-H. Kim et al. 2005; Amarzguioui et al. 2006; Amarzguioui and Rossi 2008). L'amélioration de l'intégration au complexe RISC obtenue permet alors de diminuer de manière appréciable les quantités nécessaires pour obtenir l'effet escompté de diminution de l'expression de la protéine ciblée (Jackson et al. 2003; D.-H. Kim et al. 2005). De façon concomitante, en diminuant les doses minimales requises pour obtenir un effet significatif, il est possible de diminuer les effets hors cibles (Bridge et al. 2003; Jackson et al. 2003; Sioud 2007; Whitehead et al. 2011) et notamment d'activation du système immunitaire (Doré-Savard et al. 2008; Bridge et al. 2003; Sioud 2007; Whitehead et al. 2011).

Notre groupe de recherche a été parmi les premiers à montrer qu'il était possible de diminuer l'expression d'un gène (le récepteur NTS2) au niveau du système nerveux central à l'aide de DsiRNA et également d'obtenir une réponse comportementale concordant avec cette diminution (figure 32) (Doré-Savard et al. 2008).




| | Expression ratio NTS2/RPL23 | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Saline | i-Fect | DsiRNA v2-5 | DsiRNA v1-1 |
| Spinal cord | 1.27 ± 0.14 | 0.99 ± 0.16 (22.2%) | 0.49 ± 0.12 (61.6 %)** | 0.38 ± 0.13 (70.4%)** |
| DRG | 0.92 ± 0.11 | 0.61 ± 0.35 (33.8 %) | 0.13 ± 0.05 (85.5%)*** | 0.44 ± 0.15 (51.9%)* |

**Figure 32. Validation de l'efficacité des DsiRNA à moduler l'expression du récepteur NTS2 et sa fonctionnalité en douleur aiguë.**
L'injection intrathécale de DsiRNA dirigé contre le récepteur NTS2 a induit une diminution de son expression dans la moelle épinière ainsi que dans les DRG. L'effet analgésique induit par le JMV431 dans le test du retrait de la queue a été complètement inhibé jusqu'à trois jours suivant le protocole d'injection de DsiRNA. * = p<0,05, ** = p<0,005. Modifié de (F. A. White, Jung, and Miller 2007; Doré-Savard et al. 2008).

Dans cet article, il a été montré que deux DsiRNA différents ciblant le récepteur NTS2 (nommé v1-1 et v2-5) se sont montrés efficaces pour diminuer l'expression d'ARNm du récepteur au niveau de la moelle et des DRG. De plus les DsiRNA dirigés contre le récepteur NTS2 ont été en mesure de bloquer la réponse analgésique normalement induite par le JMV431, un agoniste sélectif de ce récepteur. Mon projet portant sur cette technologie était donc en continuité avec cet article puisque nous avons voulu valider l'efficacité de ces même DsiRNA dans le test à la formaline (figure 33), encore une fois dans l'optique de tendre vers des douleurs plus proches de la douleur chronique.

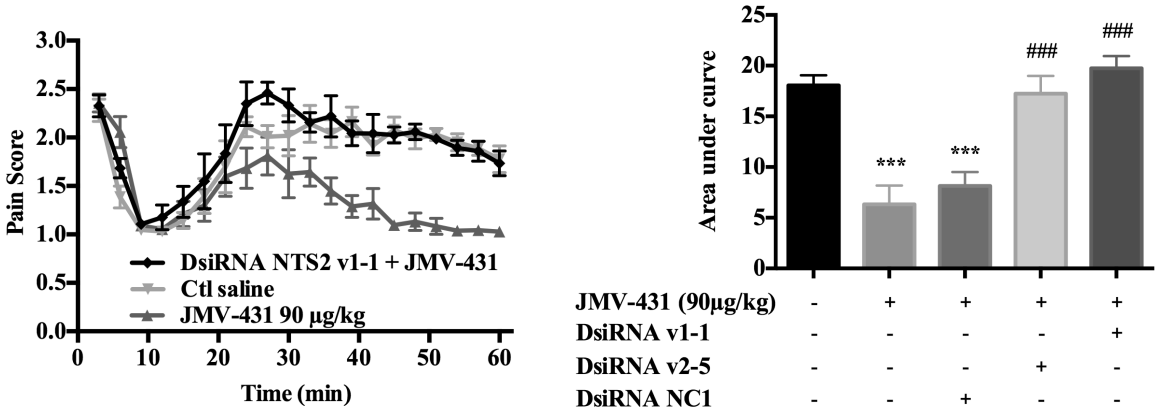



**Figure 33. Validation de l'efficacité des DsiRNA à moduler la fonctionnalité du récepteur NTS2 dans un contexte de douleur tonique.**
L'effet analgésique induit par le JMV431 dans le test à la formaline a été complètement inhibé par deux DsiRNA différents (v1-1 et v2-5) durant la phase inflammatoire (21 à 60 minutes) du test. *** = p<0,001, par rapport au groupe contrôle (barre noire) et ### = p<0,001, par rapport au groupe DsiRNA contrôle (NC1, barre du centre). n = 6. Résultats de Pascal Tétreault, non publiés.

La finalité thérapeutique recherchée est évidemment de diminuer la présence ou le développement de la douleur plutôt que de bloquer l'effet analgésique d'un composé comme réalisé dans les résultats précédents. Ces expériences ont été effectuées afin de renforcer la preuve de concept, réalisé dans l'article portant sur la douleur aiguë, qu'une modulation génique au niveau du système nerveux central est possible pour le récepteur NTS2. Les prochaines étapes seraient de valider la fonction de ce récepteur en condition de douleur chronique et également de bloquer l'expression centrale de cibles thérapeutiques pronociceptives. Différents projets du laboratoire s'intéressent à cette dernière option en modulant l'expression de la chimiokine MCP-1 et de son récepteur CCR2, montré comme étant impliqué dans la douleur neuropathique (Kaur and Sharma 2012; F. A. White, Jung, and Miller 2007).

Une revue récente fait mention de plusieurs cibles moléculaires ayant été étudiées par le biais de techniques d'interférence de l'ARN pour moduler différents types de douleur (Dorn et al. 2004; Kaur and Sharma 2012). Il est possible d'observer certaines protéines dont il a été question dans l'introduction qui sont connues pour être impliquées dans la modulation de la douleur neuropathique. Par exemple, l'expression du récepteur purinergique P2X3 a été diminuée efficacement par des siRNA et une diminution de l'allodynie et de l'hyperalgésie mécanique a été observée (Christoph et al. 2006; Dorn et al. 2004). Un autre exemple marquant est la diminution de l'expression du récepteur vanilloïde TRPV1, qui mène à une amélioration de l'allodynie au froid dans un modèle de douleur neuropathique et une diminution de la douleur viscérale suite à l'application rectale de capsaïcine (Kawasaki et al. 2008; Christoph et al. 2006). D'autres protéines comme les métalloprotéases de la matrice MMP-2 et MMP-9 ont également été modulées à l'aide de siRNA. Leur diminution a alors montré un rôle dichotomique de ces deux protéines dans le développement précoce et tardif de la douleur neuropathique (Tan, Yang, and Ji 2009; Kawasaki et al. 2008; Röhl and Kurreck 2006; K. K. Jain 2008). Tous ces articles, en accord avec les résultats obtenus au laboratoire, vont dans la même direction, à savoir que l'interférence de l'ARN et les thérapies géniques en général représentent des approches thérapeutiques fort prometteuses pour traiter la douleur. En permettant notamment de cibler des protéines réfractaires aux approches pharmacologiques classiques, il devient possible

d'espérer une guérison de certains types de douleur, plutôt que de simplement être en mesure de diminuer les symptômes (Hwang et al. 2010; Tan, Yang, and Ji 2009; Röhl and Kurreck 2006; K. K. Jain 2008).

***Perspectives***

Bien que plusieurs de mes projets de doctorat ont mené ou mèneront prochainement à une publication, un grand nombre de questions restent encore sans réponse. L'acquisition de nouveaux résultats ouvre toujours de nouvelles pistes de réflexion, c'est le principe même de la recherche. Pour moi, c'est dans cette optique que Claude Bernard, célèbre médecin français des années 1860 ayant établi les principes de la recherche scientifique, mentionne : « Ce que nous savons est le grand obstacle à l'acquisition de ce que nous ne savons pas. » Il ne faut pas que nos connaissances deviennent des œillères à notre imagination puisque de grandes découvertes ont été réalisées par-delà une vision rectiligne de la recherche. Albert Einstein, scientifique qui se passe de présentation, ajoute ceci : « L'imagination est devenue plus importante que la connaissance » en ce sens que les connaissances sont certes nécessaires, mais que le plus important est notre capacité d'appréhender avec un regard neuf et créateur les problèmes sur lesquels se porte notre réflexion.

Plusieurs facettes connexes à mes projets pourraient bénéficier de recherches supplémentaires. Par exemple, dans mon dernier projet sur la thérapie génique, différentes questions se posent : est-ce que la diminution de l'expression du récepteur NTS1 par l'interférence de l'ARN conduirait à des résultats similaires à ce qui est observé pour NTS2? Il est connu que les récepteurs NTS1 et NTS2 peuvent former des hétérodimères en condition *in vitro* (Liang et al. 2010; Hwang et al. 2010), est-ce que ce phénomène est aussi vrai en condition *in vivo*, si oui, quelle est la fonction de ce dimère? Est-ce qu'en bloquant l'expression d'un récepteur à la NT, l'expression du second en est affectée? Nos résultats préliminaires en qPCR semblent montrer que la régulation à la baisse de NTS2 par les DsiRNA affecte également à la baisse l'expression du récepteur NTS1. Est-ce que cette modulation de l'expression affecte réellement le niveau protéique, ou des stocks de

récepteur sont toujours disponibles pour un adressage du récepteur à la membrane cellulaire? Est-ce qu'il serait possible d'utiliser cette particularité à notre avantage pour potentialiser l'efficacité d'un agoniste? De façon intéressante, la diminution indirecte de l'expression du récepteur NTS1 suite à l'injection des DsiRNA contre NTS2 va à l'inverse de ce qui est observé avec les souris KO. En effet, chez les souris KO pour NTS1, on observe une augmentation de l'ARNm pour NTS2 et une augmentation de l'ARNm pour NTS1 chez les NTS2 KO (Roussy et al. 2010; Liang et al. 2010; Kleczkowska et al. 2010; Kleczkowska et al. 2013). On peut alors supposer que l'interaction fonctionnelle entre les deux récepteurs est affectée différemment si on invalide un des deux récepteurs de façon ponctuelle plutôt qu'une invalidation complète dès la naissance de l'animal. À cet égard, est-ce que l'injection de DsiRNA pour NTS1 mènerait à une augmentation ou une diminution de l'expression de NTS2 ?

En se penchant sur mes projets d'activation pharmacologique des récepteurs NTS1/2, une question relativement simple se pose : est-ce que les agonistes neurotensinergiques pourront un jour se frayer un chemin jusqu'au chevet des patients? À cette question principale, d'autres s'ajoutent : à partir de quel moment est-il possible de considérer que les études animales sont suffisantes pour passer à des tests cliniques? L'administration centrale représente un problème d'applicabilité, mais la collaboration du laboratoire avec la compagnie Angiochem a procuré des résultats encourageants, est-ce suffisant pour planifier des essais cliniques? Nous avons montré l'efficacité de certains agonistes en conditions neuropathiques, mais quels seraient les effets sur d'autres modèles de douleur chronique? Louis Doré-Savard et Geneviève Roussy, anciens collègues du laboratoire, ont montré que certains agonistes, dont le JMV431 et le JMV2009, pouvaient améliorer diverses composantes douloureuses observées dans un modèle de douleur cancéreuse chez le rat et la souris. Est-ce que l'ensemble de nos résultats est assez convainquant, ou la confirmation en conditions de douleur inflammatoire est-elle nécessaire? Le JMV2009 semble être un agoniste biaisé, en induisant majoritairement des effets bénéfiques et en s'affranchissant des effets secondaires dus à l'activation de NTS1. Il est évident que des études sont nécessaires pour confirmer ces observations, mais sont-elles nécessaires pour penser à une application thérapeutique de ce composé?

Bien que présentant des résultats fort intéressants, les agonistes neurotensinergiques ne peuvent pas espérer remplacer complètement la pharmacopée actuelle. Il serait alors intéressant de combiner ces agonistes avec différentes molécules déjà disponibles pour les patients souffrant de douleur chronique et voir s'il est possible d'obtenir un effet synergique. Différentes études ont montré que des systèmes connexes, comme le système opioïdergique, pouvaient bénéficier d'un apport neurotensinergique (Seutin, Massotte, and Dresse 1989; Roussy et al. 2010; Seutin 2005; Kleczkowska et al. 2010; Ferraro et al. 2008; Kleczkowska et al. 2013; Yin, Adermark, and Lovinger 2008; Petkova-Kirova, Rakovska, and Corte 2008; S. Li, Geiger, and Lei 2008). Comme il a été expliqué dans l'introduction, le système neurotensinergique possède la capacité d'influencer d'autres systèmes au niveau central, dont les voies sérotoninergique, glutamatergique, dopaminergique, etc. (Mosconi and Kruger 1996; Seutin, Massotte, and Dresse 1989; Seutin 2005; Ferraro et al. 2008; Yin, Adermark, and Lovinger 2008; Petkova-Kirova, Rakovska, and Corte 2008; S. Li, Geiger, and Lei 2008). Quel effet cela aurait-il sur le potentiel analgésique d'activer ces voies de façon concomitante aux voies neurotensinergiques? Nos résultats montrent également que les agonistes neurotensinergiques sont en mesure de diminuer la douleur thermique aiguë. Seraient-ils aptes à soulager d'autres douleurs aiguës comme les douleurs postopératoires? Cela pourrait élargir leur potentiel thérapeutique.

En dernier lieu, nous avons caractérisé un nouvel appareil d'évaluation des comportements douloureux qu'il est possible d'observer chez des rongeurs souffrant de douleur chronique. Serait-il possible d'utiliser ce nouvel outil dans d'autres pathologies créant des déficits posturaux ou de déplacement? Des collègues issus d'un autre laboratoire ont réalisé des tests préliminaires avec notre appareillage sur des animaux ayant subi une ischémie cérébrale unilatérale et il était possible d'observer certains problèmes de distribution de poids. Il est par contre impossible de savoir si l'appareil aurait la sensibilité requise pour valider l'efficacité de composés pouvant diminuer ces effets moteurs. En ce qui concerne la douleur, est-ce que cet appareil serait en mesure de détecter des déficits causés par des douleurs aiguës ou toniques? De plus, nous proposons que cet appareil serait capable de prédire l'efficacité de composés pour améliorer les paramètres de qualité de vie

de patients souffrant de douleur chronique, toutefois aucune preuve n'a encore été avancée. Nous espérons pourtant que la caractérisation du DWB, qui s'insère dans un vaste courant de recherche en douleur, permettra de développer de nouveaux traitements analgésiques pour soulager les patients atteints de douleur chronique

***Réflexions et ouverture***

Une des principales difficultés lors de l'écriture d'une thèse de doctorat est, à mon avis, de réussir à en faire un tout cohérent. La quantité de littérature disponible de nos jours est telle qu'il est facile de partir dans plusieurs directions à la fois. J'espère ici avoir été en mesure de rédiger un tout complet et logique décrivant la complexité derrière la compréhension et le traitement de la douleur chronique, appliqué à l'exemple de la douleur neuropathique.

Je considère que la capacité d'autocritique est importante pour bien réussir en recherche. Il est important d'être capable de regarder son travail à vol d'oiseau et d'identifier les points qui pourraient ou auraient pu être améliorés. C'est ainsi que dans l'optique de repenser mon projet, différents éléments pourraient être modifiés afin de l'améliorer. Tout d'abord, le modèle de douleur neuropathique choisi aurait probablement été différent. Comme mentionné dans l'introduction, le modèle de Bennett comporte plusieurs avantages, mais également certains inconvénients de reproductibilité interindividuelle en plus d'induire des troubles moteurs marqués pouvant affecter les paramètres qui sont analysés durant les expériences. D'autres modèles auraient pu être utilisés, comme le modèle de Mosconi (Walczak et al. 2005; Mosconi and Kruger 1996), permettant une meilleure reproductibilité ou le modèle de Walczack (Walczak et al. 2005), affectant un nerf uniquement sensoriel. Il aurait été également envisageable de créer un nouveau modèle, mais cette approche aurait nécessité des étapes de validations supplémentaires avant de pouvoir tester des composés analgésiques. Ensuite, en plus des résultats de qPCR montrant l'expression génique du système neurotensinergique en conditions de douleur neuropathique, il aurait été pertinent d'avoir le pendant protéique, par immunohistologie et immunobuvardage de type Western, afin de confirmer les différences

observées au niveau de l'ARNm. Ces résultats ajouteraient du poids à nos observations et sur le rôle de ce système en condition neuropathique. De plus, il aurait été intéressant d'avoir ce même profil d'expression génique et protéique après les injections d'agonistes neurotensinergiques. Ces résultats pourraient indiquer si l'ajout exogène de ligand des récepteurs $NTS_{1/2}$ influence positivement ou négativement le système, permettant subséquemment de raffiner l'approche thérapeutique. Dans notre deuxième étude sur l'activation du récepteur $NTS_2$, il aurait été pertinent de procéder à des courbes doses-réponse pour tous les agonistes testés, en plus des molécules de références. Il aurait alors été possible d'observer que certains composés actuellement prescrits seraient peut-être en mesure d'améliorer certains paramètres de la qualité de vie. Il va de soi que mon doctorat m'a appris comment mener des expériences, mais de façon plus importante encore, ces années de travail ont fait progresser ma façon de penser. Comme l'a dit Georges Bernanos, écrivain français de la fin du 19e siècle : « La pensée qui ne conduit pas à l'action ne vaut pas grand-chose, mais l'action qui ne procède pas de la pensée ne vaut rien du tout. »

***Conclusion***

Il est difficile de conclure en quelques mots le travail réalisé durant cinq années de recherche. Mais comme toute bonne chose a une fin, en voici une courte conclusion. Nous avons tout d'abord poussé plus loin la compréhension et la validation du potentiel thérapeutique du système neurotensinergique suivant différents paradigmes de douleur expérimentale, allant de la douleur aiguë à la douleur chronique. Nous avons montré, à l'aide d'un nouvel appareil d'évaluation de la douleur, que ce système semble être en mesure d'améliorer des paramètres de douleur considérés comme beaucoup plus proches de la réalité vécue par les patients, composantes qui sont encore actuellement très peu évaluées en recherche préclinique. L'efficacité des agonistes neurotensinergiques à améliorer certains paramètres de qualité de vie identifié renforce grandement leur pertinence clinique. De plus, les recherches que nous avons réalisées sur l'utilisation d'une génération de siRNA à la fine pointe de la technologie représentent une approche non pharmacologique qui semble particulièrement prometteuse. Elle pourrait être utilisée seule ou en combinaison avec une approche pharmacologique et pourrait ainsi induire un puissant effet

analgésique tout en limitant les effets secondaires. Des expériences supplémentaire seront toutefois nécessaire afin de compléter la caractérisation du potentiel thérapeutique du système neurotensinergique et des approches pharmacologiques et non-pharmacologiques employées dans cette thèse. L'ensemble de mes résultats démontrent, encore une fois, que la douleur prise comme une entité pathologique distincte est un phénomène multifactoriel complexe qui nécessite encore beaucoup de recherche avant de pouvoir percer les mystères qui mèneront à sa guérison.

# Remerciements

Le doctorat est un parcours long et parsemé d'obstacles de tout genre. Il est de nos jours impossible de mener à bien un tel projet sans l'aide et le support de nombreuses personnes. Que ce soit nos collègues, nos amis, notre superviseur, notre famille, tous ont un rôle à jouer dans l'accomplissement de cette grande tâche. J'aimerais ici profiter de l'occasion pour remercier différentes personnes qui m'ont accompagné dans cette grande étape de ma vie. Je vais assurément oublier de nommer certaines personnes qui ont contribué à un moment ou un autre au bon déroulement de mon doctorat, mais il ne faut pas le prendre personnel et je vous remercie tous énormément !

Le Pr Philippe Sarret est évidemment la première personne à remercier pour mon doctorat. Il a cru en moi et en mes capacités au moment de mon entrevue et depuis mon premier jour au laboratoire en septembre 2008. Philippe a toujours été un superviseur présent, patient, aidant et à l'écoute durant mes cinq années passées au laboratoire. Il a su m'encourager à me dépasser dans l'accomplissement de mes expériences et dans l'écriture des nombreux résumés de congrès, articles et chapitres de livre que j'ai eu le plaisir d'écrire avec lui durant mon parcours de doctorat. Il s'est toujours montré généreux dans son temps passé avec ses étudiants et dans la possibilité d'assister à des congrès tant au Québec, qu'au Canada et qu'à l'international. Sa rigueur scientifique et sa grande connaissance scientifique sont un modèle pour moi et me poussent quotidiennement à chercher à en connaître plus. Je remercie aussi Philippe de m'avoir initié au soccer, sport que j'apprécie maintenant énormément…même s'il m'a causé quelques blessures ! Grâce à tout cela, je suis convaincu que Philippe a fait de moi un meilleur scientifique et une meilleure personne et je lui en serai reconnaissant durant le reste de ma carrière. J'espère que le lien d'amitié et de collaboration scientifique que nous avons développé continuera malgré mon départ du laboratoire.

Bras droit de Philippe depuis le début du laboratoire, et récemment exilé chez nos compatriotes de la Colombie-Britanique, Nicolas a été un élément important pour moi au laboratoire. Il a toujours été d'une grande aide pour la gestion quotidienne de mes

expériences. Doué d'une grande capacité de réflexion, il a toujours poussé nos idées à des niveaux supérieurs. Son discours franc et sans détour était parfois rude à entendre, mais m'a toujours amener à me dépasser et je lui en suis aujourd'hui reconnaissant ! Amis également dans la vie hors laboratoire, son hyperactivité légendaire est toujours agréable pour nos sessions de vélo, soccer, frisbee, et tout autre sport que j'ai eu la chance de pratiquer avec lui !

Notre laboratoire ne serait pas aussi productif sans l'apport technique de qualité de nos techniciennes. Karine, qui est là depuis pratiquement le tout début du laboratoire, est une mine d'informations et de conseils de tout genre. Sa force de caractère peut parfois nous troubler, mais il en ressort toujours du mieux. J'ai appris beaucoup de sa rigueur méthodologique et mes expériences n'en sont aujourd'hui que mieux structurées. Karyn a joint l'équipe il y a quelques années et a toujours été d'une aide discrète, mais importante. Étant anglophone, elle m'a aidé à plusieurs fois pour améliorer des phrases d'anglais.

J'ai eu la chance d'arriver au laboratoire avec une équipe d'étudiants bien établie qui a grandement facilité mon intégration. Geneviève, Louis, Marc-André et Mylène m'ont accueilli et m'ont aidé à m'initier à la particularité de la recherche animale…moi qui n'avais vu que des cellules durant ma maîtrise ! Alexandre est arrivé en même temps que moi au laboratoire et j'ai découvert en lui non seulement un excellent collègue, mais un ami. Je garderai avec eux de bons liens d'amitié et de futures collaborations scientifiques.

J'ai eu la chance également de côtoyer plusieurs autres étudiants durant mon doctorat, le laboratoire du Pr Sarret étant un des plus nombreux de la FMSS. J'ai de ce fait beaucoup appris en travaillant avec Mounir, Valérie, Myriam, Jessica, Élie, Alexandre M. et David. Je remercie aussi les stagiaires Marylie, Élora, Samuel, Gabriel, Julie, Stéphanie et Mélisange dont certains étaient sous ma supervision, et dont quelques-uns sont maintenant ou prochainement de nouveaux étudiants du laboratoire. On apprend beaucoup en enseignant, de devoir expliquer une expérience permet de voir ses forces et ses faiblesses et ensuite d'améliorer notre approche.

La liste de collaborateurs avec qui j'ai eu la chance de travailler est longue, mais je tenais à mentionner notamment le professeur Louis Gendron et son équipe, les différentes équipes française qui ont développé certains agonistes utilisés durant mon doctorat, la compagnie Bioseb, l'équipe de recherche et développement de chez IDT, etc.

La vie en dehors du laboratoire est aussi très importante pour réussir à passer à travers le doctorat tout en gardant un esprit sain dans un corps sain ! J'ai ainsi eu l'opportunité de patiner pendant quelques années au club de patinage de vitesse de Sherbrooke ou j'ai rencontré plusieurs personnes qui sont aujourd'hui des amis proches. Maxime (qui a même été mon colocataire durant 1 an !), Francis, Mathieu, Samuel, Catherine sont tous des personnes que je suis triste de quitter pour mon futur séjour américain, mais que je suis sûr que nous allons conserver de bons liens d'amitié, que je revienne ou non à Sherbrooke par la suite.

L'environnement familial est évidemment ce qui nous guide dans notre vie depuis nos premiers balbutiements. Mes parents, Michèle et Michel et mes frères et sœurs, Samuel, Olivier, Laurence et Violaine, même s'ils avaient parfois du mal à bien comprendre ce que je fais dans la vie, m'ont toujours supporté et ont toujours été fiers de mes accomplissements. Ils ont suivi ma progression et m'ont souvent écouté attentivement parler de mes projets de recherche. Un merci tout spécial à ma mère qui a été ma relectrice et ma correctrice pour de nombreux écrits durant mon doctorat, dont le plus volumineux, ma thèse. Son esprit scientifique et sa maîtrise de la langue française ont toujours amélioré les textes qui passaient sous son œil !

Je remercie évidemment énormément ma conjointe depuis plus de neuf ans (déjà !), Fanny, qui a toujours été présente dans les moments difficiles comme les moments heureux de ma vie et de mon cheminement académique. Elle m'a sans cesse encouragé à me dépasser dans les différentes étapes de mon doctorat. Elle a été à tour de rôle ma muse, ma conseillère scientifique, ma conscience, mon oreille, mon énergie, etc. Je la remercie d'être qui elle est et de voir de bon œil mon départ prochain pour Chicago ; comme une flèche qui

se fait tirer dans son arc, nous sommes en phase de recul pour pouvoir nous projeter plus loin dans les années à venir !

Merci aux membres de mon jury, qui ont accepté de réviser cette thèse, et de lire jusqu'au dernier mot ces 200 quelques pages de texte majoritairement scientifique !

# Annexe

**L'interférence de l'ARN : une nouvelle approche pour traiter la douleur**

Pascal G. Tétreault, Nicolas Beaudet, Philippe Sarret
Université de Sherbrooke, département de physiologie et biophysique
Centre des neurosciences de Sherbrooke

Publié dans : Douleur & Analgésie. 2011. 24:S30-S42

À ce jour, une large panoplie de médicaments est à la disposition des médecins pour atténuer la douleur. Pourtant, les traitements pharmacologiques actuels demeurent encore inefficaces pour soulager les douleurs chroniques, d'origine neuropathique ou encore cancéreuse [2]. Il convient donc d'exploiter au mieux les technologies les plus récentes pour tenter d'enrayer les douleurs chroniques rebelles. Depuis quelques années, la thérapie génique a obtenu ses lettres de noblesse et devient de plus en plus une approche réaliste dans un contexte de traitement clinique. L'interférence de l'ARN a été découverte en 1998 chez le vers *c. elegans* [3]. Cette approche a mené en particulier à l'élaboration d'études cliniques, portant sur l'utilisation des siRNA pour traiter la dégénérescence maculaire [5]. Plus récemment, le développement d'une nouvelle génération de molécules d'interférence de l'ARN, nommée DsiRNA (pour Dicer-substrate siRNA) [4], a élargi le potentiel thérapeutique de cette approche non pharmacologique.

Un des principaux avantages des DsiRNA, par rapport au siRNA de première génération, est qu'il est possible d'obtenir une inhibition génique plus élevée avec une quantité plus faible. Ceci permet alors de diminuer la réponse inflammatoire normalement observée lorsqu'une forte concentration d'ARN bicaténaire est injectée dans un organisme. Ce phénomène s'explique par les mécanismes d'action des différents types de siRNA. Comme il est indiqué dans la figure 1 [7] deux principaux mécanismes sont possibles pour l'interférence de l'ARN. Le mécanisme endogène, qui est représenté par les miRNA (pour micro RNA), intervient naturellement dans les cellules et peut être indirectement modulé. Dans le cas des mécanismes exogènes, deux voies principales existent. Tout d'abord, dans le cas des siRNA, le dimère de 21 paires de bases est directement incorporé dans le complexe RISC (RNA Induced Silencing Complex), s'ensuit l'activation de RISC afin de

dégrader l'ARNm du gène ciblé. Dans le cas des DsiRNA, le dimère de 27 paires de base subit une étape préliminaire de clivage par l'endoribonucléase DICER. Ce clivage est dirigé vers des régions spécifiques de la molécule de DsiRNA, ce qui favorise sa préparation et son intégration subséquente dans le complexe RISC. Cette stratégie augmente le taux de molécules prisent en charge par RISC, diminuant la concentration nécessaire pour induire l'interférence et minimisant par le fait même les effets secondaires, soit l'inflammation et les effets « off-target » [4].

Cette technique a déjà été utilisée avec succès *in vivo* en périphérie [6] et nous avons déjà démontré le potentiel de cette technique au niveau central dans la modulation de la douleur aiguë [1]. Toutefois, afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de cette technique dans un contexte de douleur persistante, nous avons examiné l'efficacité de ces DsiRNA dans le modèle de douleur tonique, situé à l'interface entre une douleur dite aiguë et chronique. En utilisant le récepteur NTS2 de la neurotensine comme gène cible, nous avons ainsi démontré que l'injection intrathécale de DsiRNA dirigé contre ce récepteur conduisait à une réduction sélective de l'expression de ce dernier dans les tissus cibles (ganglions spinaux et moelle épinière). L'efficacité analgésique de ces DsiRNA-NTS2 a ensuite été évaluée en condition de douleur tonique persistante. De cette manière, nous avons observé que deux injections à faible dose (5 µg) à 24 heures d'intervalle, de deux DsiRNA ciblant NTS2, menaient à une diminution importante de l'effet analgésique d'un agoniste sélectif de NTS2, le JMV431, administré par voie spinale à la dose de 90µg/kg. Ces résultats démontrent donc le potentiel des DsiRNA à moduler un gène au niveau du système nerveux central dans un contexte de douleur tonique. À la lumière de ces résultats, l'application de cette technologie dans un paradigme de douleur chronique présente un potentiel élevé. En ciblant un gène pro-nociceptif, il serait ainsi possible d'obtenir un effet analgésique tout en évitant les effets secondaires associés aux traitements pharmacologiques classiques.

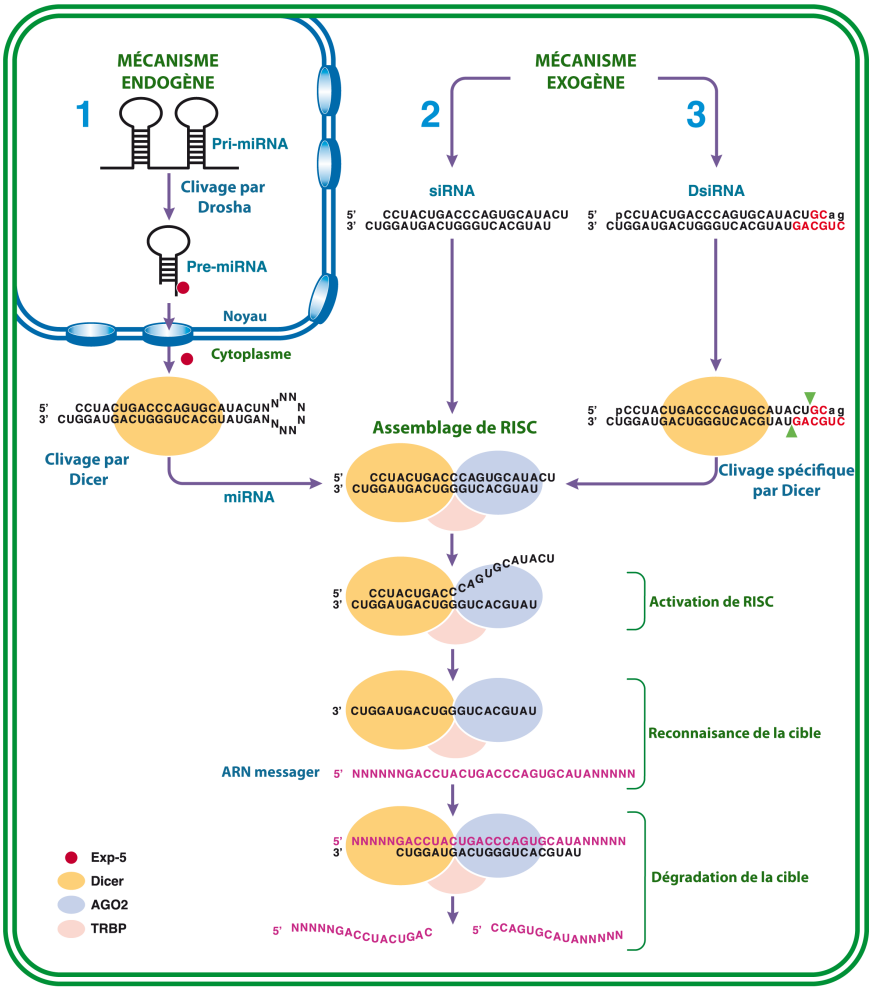



**Figure 1. Schéma illustrant les principales voies d'interférences de l'ARN**.
1. Mécanisme endogène utilisant les miRNA. 2. siRNA passant par le mécanisme exogène sans étape de clivage par la protéine DICER. 3. DsiRNA passant par le mécanisme exogène avec une étape de clivage par DICER avant son intégration dans le complexe RISC. (Tiré de Sarret *et al.* Dans *G protein coupled receptor technology, chapitre 19 : Using RNA interference to down-regulate G-protein-coupled receptors)*


1. Doré-Savard, L., G. Roussy, M.-A. Dansereau, et al., *Central delivery of Dicer-substrate siRNA: a direct application for pain research.* Mol Ther, 2008. **16**(7): p. 1331-9.
2. Dray, A., *Neuropathic pain: emerging treatments.* British Journal of Anaesthesia, 2008. **101**(1): p. 48-58.
3. Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans.* Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
4. Kim, D.-H., M.A. Behlke, S.D. Rose, et al., *Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy.* Nat Biotechnol, 2005. **23**(2): p. 222-6.

5. Kurreck, J., *RNA interference: from basic research to therapeutic applications.* Angew Chem Int Ed Engl, 2009. **48**(8): p. 1378-98.
6. Nawroth, I., J. Alsner, M.A. Behlke, et al., *Intraperitoneal administration of chitosan/DsiRNA nanoparticles targeting TNFα prevents radiation-induced fibrosis.* Radiother Oncol, 2010. **97**(1): p. 143-8.
7. Sarret, P., L. Doré-Savard, P. Tétreault, et al., *Chapter 19 : Using RNA interference to down-regulate G-protein-coupled receptors*, in *G protein coupled receptor technology*, Springer-Verlag, Editor. 2011.

## Références


Abraham, Michael H, William E Acree, Albert J Leo, David Hoekman, and Joseph E Cavanaugh. 2010. "Water-Solvent Partition Coefficients and Delta Log P Values as Predictors for Blood-Brain Distribution; Application of the Akaike Information Criterion.." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 99 (5) (May): 2492–2501. doi:10.1002/jps.22010.

Akunne, H C, S Darling, K Zoski, A M Sefler, J X He, T K Sawyer, T A Pugsley, and W L Cody. 1996. "Functional Activity of New C-Terminal Cyclic-Neurotensin Fragment Analogs.." *Neuropeptides* 30 (3) (June): 213–218.

al-Rodhan, N R, E Richelson, J A Gilbert, D J McCormick, K S Kanba, M A Pfenning, A Nelson, E W Larson, and T L Yaksh. 1991. "Structure-Antinociceptive Activity of Neurotensin and Some Novel Analogues in the Periaqueductal Gray Region of the Brainstem.." *Brain Research* 557 (1-2) (August 23): 227–235.

Amar, S, J Mazella, F Checler, P Kitabgi, and J P Vincent. 1985. "Regulation of Cyclic GMP Levels by Neurotensin in Neuroblastoma Clone N1E115.." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 129 (1) (May 31): 117–125.

Amarzguioui, Mohammed, and JJ Rossi. 2008. "Principles of Dicer Substrate (D-siRNA) Design and Function." *Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ)* 442: 3–10. doi:10.1007/978-1-59745-191-8_1.

Amarzguioui, Mohammed, Patric Lundberg, Edouard Cantin, James Hagstrom, Mark A Behlke, and John J Rossi. 2006. "Rational Design and in Vitro and in Vivo Delivery of Dicer Substrate siRNA." *Nature Protocols* 1 (2): 508–517. doi:10.1038/nprot.2006.72.

Amir, Ron, Jeffery D Kocsis, and Marshall Devor. 2005. "Multiple Interacting Sites of Ectopic Spike Electrogenesis in Primary Sensory Neurons.." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (10) (March 9): 2576–2585. doi:10.1523/JNEUROSCI.4118-04.2005.

Andersson, L, L Blomberg, M Flegel, L Lepsa, B Nilsson, and M Verlander. 2000. "Large-Scale Synthesis of Peptides.." *Biopolymers* 55 (3): 227–250. doi:10.1002/1097-0282(2000)55:3<227::AID-BIP50>3.0.CO;2-7.

Andrews, N, E Legg, D Lisak, Y Issop, D Richardson, S Harper, T Pheby, et al. 2012. "Spontaneous Burrowing Behaviour in the Rat Is Reduced by Peripheral Nerve Injury or Inflammation Associated Pain.." *European Journal of Pain (London, England)* 16 (4) (April): 485–495. doi:10.1016/j.ejpain.2011.07.012.

Andrews, Nick, Sinead Harper, Yasmin Issop, and Andrew S C Rice. 2011. "Novel, Nonreflex Tests Detect Analgesic Action in Rodents at Clinically Relevant Concentrations.." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1245 (December): 11–13. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06342.x.

Angeby-Möller, Kristina, Susanne Kinert, Rolf Størkson, and Odd-Geir Berge. 2012. "Gait Analysis in Rats with Single Joint Inflammation: Influence of Experimental Factors.." *PloS One* 7 (10): e46129. doi:10.1371/journal.pone.0046129.

Apfel, S C, A K Asbury, V Bril, T M Burns, J N Campbell, C H Chalk, P J Dyck, et al. 2001. "Positive Neuropathic Sensory Symptoms as Endpoints in Diabetic Neuropathy Trials.." *Journal of the Neurological Sciences* 189 (1-2) (August 15): 3–5.

Apkarian, A Vania. 2011. “The Brain in Chronic Pain: Clinical Implications..” *Pain Management* 1 (6) (November 1): 577–586. doi:10.2217/pmt.11.53.

Apkarian, A Vania, Javeria A Hashmi, and Marwan N Baliki. 2011. “Pain and the Brain: Specificity and Plasticity of the Brain in Clinical Chronic Pain..” *Pain* 152 (3 Suppl) (March): S49–64. doi:10.1016/j.pain.2010.11.010.

Asiedu, Marina N, Dipti V Tillu, Ohannes K Melemedjian, Adia Shy, Raul Sanoja, Bryce Bodell, Sourav Ghosh, Frank Porreca, and Theodore J Price. 2011. “Spinal Protein Kinase M Z Underlies the Maintenance Mechanism of Persistent Nociceptive Sensitization..” *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (18) (May 4): 6646–6653. doi:10.1523/JNEUROSCI.6286-10.2011.

Asselin, M L, I Dubuc, A Coquerel, and J Costentin. 2001. “Localization of Neurotensin NTS2 Receptors in Rat Brain, Using.” *Neuroreport* 12 (5) (April 17): 1087–1091.

Attal, Nadine. 2012. “Neuropathic Pain: Mechanisms, Therapeutic Approach, and Interpretation of Clinical Trials..” *Continuum (Minneapolis, Minn.)* 18 (1) (February): 161–175. doi:10.1212/01.CON.0000411564.41709.2d.

Authier, Nicolas, David Balayssac, Fabien Marchand, Bing Ling, Aude Zangarelli, Juliette Descoeur, François Coudore, Emmanuel Bourinet, and Alain Eschalier. 2009. “Animal Models of Chemotherapy-Evoked Painful Peripheral Neuropathies.” *Neurotherapeutics : the Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 6 (4) (October 1): 620–629. doi:10.1016/j.nurt.2009.07.003.

Baell, Jonathan, Miles Congreve, Paul Leeson, and Celerino Abad-Zapatero. 2013. “Ask the Experts: Past, Present and Future of the Rule of Five..” *Future Medicinal Chemistry* 5 (7) (May): 745–752. doi:10.4155/fmc.13.61.

Baliki, Marwan N, Bogdan Petre, Souraya Torbey, Kristina M Herrmann, Lejian Huang, Thomas J Schnitzer, Howard L Fields, and A Vania Apkarian. 2012. “Corticostriatal Functional Connectivity Predicts Transition to Chronic Back Pain..” *Nature Neuroscience* 15 (8) (August): 1117–1119. doi:10.1038/nn.3153.

Baliki, Marwan N, Thomas J Schnitzer, William R Bauer, and A Vania Apkarian. 2011. “Brain Morphological Signatures for Chronic Pain..” *PloS One* 6 (10): e26010. doi:10.1371/journal.pone.0026010.

Baliki, Marwan, Oscar Calvo, Dante R Chialvo, and A Vania Apkarian. 2005. “Spared Nerve Injury Rats Exhibit Thermal Hyperalgesia on an Automated Operant Dynamic Thermal Escape Task..” *Molecular Pain* 1: 18. doi:10.1186/1744-8069-1-18.

Banks, William A. 2009. “Characteristics of Compounds That Cross the Blood-Brain Barrier.” *BMC Neurology* 9 (Suppl 1): S3. doi:10.1186/1471-2377-9-S1-S3.

Basbaum, A I, and H L Fields. 1984. “Endogenous Pain Control Systems: Brainstem Spinal Pathways and Endorphin Circuitry..” *Annual Review of Neuroscience* 7: 309–338. doi:10.1146/annurev.ne.07.030184.001521.

Basbaum, Allan I, Diana M Bautista, Grégory Scherrer, and David Julius. 2009. “Cellular and Molecular Mechanisms of Pain.” *Cell* 139 (2) (October 16): 267–284. doi:10.1016/j.cell.2009.09.028.

Bee, Lucy A, and Anthony H Dickenson. 2008. “Descending Facilitation From the Brainstem Determines Behavioural and Neuronal Hypersensitivity Following Nerve Injury and Efficacy of Pregabalin..” *Pain* 140 (1) (November 15): 209–223. doi:10.1016/j.pain.2008.08.008.

Beggs, Simon, and Michael W Salter. 2007. “Stereological and Somatotopic Analysis of the Spinal Microglial Response to Peripheral Nerve Injury..” *Brain, Behavior, and*

*Immunity* 21 (5) (July): 624–633. doi:10.1016/j.bbi.2006.10.017.

Behbehani, M M, and A Pert. 1984. "A Mechanism for the Analgesic Effect of Neurotensin as Revealed by Behavioral and Electrophysiological Techniques.." *Brain Research* 324 (1) (December 17): 35–42.

Behlke, Mark A. 2006. "Progress Towards in Vivo Use of siRNAs." *Molecular Therapy : the Journal of the American Society of Gene Therapy* 13 (4) (April 1): 644–670. doi:10.1016/j.ymthe.2006.01.001.

Behlke, Mark A. 2008. "Chemical Modification of siRNAs for in Vivo Use." *Oligonucleotides* 18 (4) (December 1): 305–319. doi:10.1089/oli.2008.0164.

Bell, Charles. 1824. "An Exposition of the Natural System of the Nerves of the Human Body, with a Republication of the Papers Delivered to the Royal Society."

Bennett, G J. 1999. "Does a Neuroimmune Interaction Contribute to the Genesis of Painful Peripheral Neuropathies?." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (14) (July 6): 7737–7738.

Bennett, G J, and Y K Xie. 1988. "A Peripheral Mononeuropathy in Rat That Produces Disorders of Pain Sensation Like Those Seen in Man." *Pain* 33 (1) (April 1): 87–107.

Bennett, Gary J. 2012. "What Is Spontaneous Pain and Who Has It?." *The Journal of Pain : Official Journal of the American Pain Society* 13 (10) (October): 921–929. doi:10.1016/j.jpain.2012.05.008.

Berger, Julie V, Liesbeth Knaepen, Sofie P M Janssen, Robby J P Jaken, Marco A E Marcus, Elbert A J Joosten, and Ronald Deumens. 2011. "Cellular and Molecular Insights Into Neuropathy-Induced Pain Hypersensitivity for Mechanism-Based Treatment Approaches.." *Brain Research Reviews* 67 (1-2) (June 24): 282–310. doi:10.1016/j.brainresrev.2011.03.003.

Berrocoso, Esther, Juan-Antonio Mico, Olivier Vitton, Philippe Ladure, Adrian Newman-Tancredi, Ronan Depoortère, and Laurent Bardin. 2011. "Evaluation of Milnacipran, in Comparison with Amitriptyline, on Cold and Mechanical Allodynia in a Rat Model of Neuropathic Pain.." *European Journal of Pharmacology* 655 (1-3) (March 25): 46–51. doi:10.1016/j.ejphar.2011.01.022.

Bertrand, Yanick, Jean-Christophe Currie, Michel Demeule, Anthony Régina, Christian Ché, Abedelnasser Abulrob, Dorothy Fatehi, et al. 2010. "Transport Characteristics of a Novel Peptide Platform for CNS Therapeutics.." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14 (12) (December): 2827–2839. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00930.x.

Bhangoo, Sonia K, Dongjun Ren, Richard J Miller, David M Chan, Matthew S Ripsch, Clarissa Weiss, Christian McGinnis, and Fletcher A White. 2007. "CXCR4 Chemokine Receptor Signaling Mediates Pain Hypersensitivity in Association with Antiretroviral Toxic Neuropathy.." *Brain, Behavior, and Immunity* 21 (5) (July): 581–591. doi:10.1016/j.bbi.2006.12.003.

Bissette, G, C B Nemeroff, P T Loosen, A J Prange, and M A Lipton. 1976. "Hypothermia and Intolerance to Cold Induced by Intracisternal Administration of the Hypothalamic Peptide Neurotensin.." *Nature* 262 (5569) (August 12): 607–609.

Blackburn-Munro, Gordon. 2004. "Pain-Like Behaviours in Animals – How Human Are They?." *Trends in Pharmacological Sciences* 25 (6) (June): 299–305. doi:10.1016/j.tips.2004.04.008.

Blumberg, H, H B Dayton, and P S Wolf. 1966. "Counteraction of Narcotic Antagonist Analgesics by the Narcotic Antagonist Naloxone.." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine*

*(New York, N.Y.)* 123 (3) (December): 755–758.

Blumberg, H, P S Wolf, and H B Dayton. 1965. "Use of Writhing Test for Evaluating Analgesic Activity of Narcotic Antagonists.." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 118 (March): 763–766.

Blumenkopf, B, and J J Lipman. 1991. "Studies in Autotomy: Its Pathophysiology and Usefulness as a Model of Chronic Pain." *Pain*.

Botto, J M, E Guillemare, J P Vincent, and J Mazella. 1997. "Effects of SR 48692 on Neurotensin-Induced Calcium-Activated Chloride Currents in the Xenopus Oocyte Expression System: Agonist-Like Activity on the Levocabastine-Sensitive Neurotensin Receptor and Absence of Antagonist Effect on the Levocabastine Insensitive Neurotensin Receptor.." *Neuroscience Letters* 223 (3) (February 28): 193–196.

Botto, J M, J Chabry, P Sarret, J P Vincent, and J Mazella. 1998. "Stable Expression of the Mouse Levocabastine-Sensitive Neurotensin Receptor in HEK 293 Cell Line: Binding Properties, Photoaffinity Labeling, and Internalization Mechanism.." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 243 (2) (February 13): 585–590. doi:10.1006/bbrc.1997.8071.

Bouhassira, Didier, Michel Lantéri-Minet, Nadine Attal, Bernard Laurent, and Chantal Touboul. 2008. "Prevalence of Chronic Pain with Neuropathic Characteristics in the General Population.." *Pain* 136 (3) (June): 380–387. doi:10.1016/j.pain.2007.08.013.

Boulanger, Aline. 2008. "Recommandationsd'un Forum Québécoissur La Douleur Neuropathique." *L'actualité Médicale* (May 26): 1–12.

Boules, M, A Shaw, Y Liang, D Barbut, and E Richelson. 2009. "NT69L, a Novel Analgesic, Shows Synergy with Morphine.." *Brain Research* 1294 (October 19): 22–28. doi:10.1016/j.brainres.2009.07.086.

Boules, Mona, Beth McMahon, Rui Wang, Lewis Warrington, Jennifer Stewart, Sally Yerbury, Abdul Fauq, Daniel McCormick, and Elliott Richelson. 2003. "Selective Tolerance to the Hypothermic and Anticataleptic Effects of a Neurotensin Analog That Crosses the Blood-Brain Barrier.." *Brain Research* 987 (1) (October 10): 39–48.

Boules, Mona, Hannah Johnston, Jessica Tozy, Kristin Smith, Zhimin Li, and Elliott Richelson. 2011. "Analgesic Synergy of Neurotensin Receptor Subtype 2 Agonist NT79 and Morphine.." *Behavioural Pharmacology* 22 (5-6) (September): 573–581. doi:10.1097/FBP.0b013e3283474a3a.

Boules, Mona, Zhimin Li, Kristin Smith, Paul Fredrickson, and Elliott Richelson. 2013. "Diverse Roles of Neurotensin Agonists in the Central Nervous System.." *Frontiers in Endocrinology* 4: 36. doi:10.3389/fendo.2013.00036.

Boulton, A J M, R A Malik, J C Arezzo, and J M Sosenko. 2004. "Diabetic Somatic Neuropathies." *Diabetes Care* 27 (6) (June 1): 1458–1486. doi:10.2337/diacare.27.6.1458.

Boyd, Benjamin S, Christian Puttlitz, Linda J Noble-Haeusslein, Constance M John, Alpa Trivedi, and Kimberly S Topp. 2007. "Deviations in Gait Pattern in Experimental Models of Hindlimb Paresis Shown by a Novel Pressure Mapping System.." *Journal of Neuroscience Research* 85 (10) (August 1): 2272–2283. doi:10.1002/jnr.21366.

Bozkurt, A, R Deumens, J Scheffel, D M O'Dey, J Weis, E A Joosten, T Führmann, G A Brook, and N Pallua. 2008. "CatWalk Gait Analysis in Assessment of Functional Recovery After Sciatic Nerve Injury." *Journal of Neuroscience Methods* 173 (1) (August 15): 91–98. doi:10.1016/j.jneumeth.2008.05.020.

Bozou, J C, F de Nadai, J P Vincent, and P Kitabgi. 1989. "Neurotensin, Bradykinin and Somatostatin Inhibit cAMP Production in Neuroblastoma N1E115 Cells via Both Pertussis Toxin Sensitive and Insensitive Mechanisms.." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 161 (3) (June 30): 1144–1150.

Bredeloux, Pierre, Florine Cavelier, Isabelle Dubuc, Bertrand Vivet, Jean Costentin, and Jean Martinez. 2008. "Synthesis and Biological Effects of C(Lys-Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu-Lys-Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu) (JMV2012), a New Analogue of Neurotensin That Crosses the Blood-Brain Barrier.." *Journal of Medicinal Chemistry* 51 (6) (March 27): 1610–1616. doi:10.1021/jm700925k.

Bridge, Alan J, Stephanie Pebernard, Annick Ducraux, Anne-Laure Nicoulaz, and Richard Iggo. 2003. "Induction of an Interferon Response by RNAi Vectors in Mammalian Cells.." *Nature Genetics* 34 (3) (July): 263–264. doi:10.1038/ng1173.

Brightwell, J, and B Taylor. 2009. "Noradrenergic Neurons in the Locus Coeruleus Contribute to Neuropathic Pain." *Neuroscience* (February 14). doi:10.1016/j.neuroscience.2009.02.023.

Brooks, Jonathan, and Irene Tracey. 2005. "From Nociception to Pain Perception: Imaging the Spinal and Supraspinal Pathways.." *Journal of Anatomy* 207 (1) (July): 19–33. doi:10.1111/j.1469-7580.2005.00428.x.

Brown, M, and W Vale. 1976. "Effects of Neurotensin and Substance P on Plasma Insulin, Glucagon and Glucose Levels.." *Endocrinology* 98 (3) (March): 819–822.

Buchheit, Thomas, Thomas Van de Ven, and Andrew Shaw. 2012. "Epigenetics and the Transition From Acute to Chronic Pain.." *Pain Medicine (Malden, Mass)* 13 (11) (November): 1474–1490. doi:10.1111/j.1526-4637.2012.01488.x.

Buhler, A V, H K Proudfit, and G F Gebhart. 2008. "Neurotensin-Produced Antinociception in the Rostral Ventromedial Medulla Is Partially Mediated by Spinal Cord Norepinephrine.." *Pain* 135 (3) (April): 280–290. doi:10.1016/j.pain.2007.06.010.

Buhler, A V, J Choi, H K Proudfit, and G F Gebhart. 2005. "Neurotensin Activation of the NTR1 on Spinally-Projecting Serotonergic Neurons in the Rostral Ventromedial Medulla Is Antinociceptive.." *Pain* 114 (1-2) (March): 285–294. doi:10.1016/j.pain.2004.12.031.

Bumcrot, David, Muthiah Manoharan, Victor Koteliansky, and Dinah W Y Sah. 2006. "RNAi Therapeutics: a Potential New Class of Pharmaceutical Drugs.." *Nature Chemical Biology* 2 (12) (December): 711–719. doi:10.1038/nchembio839.

Calvo, Margarita, John M Dawes, and David L H Bennett. 2012. "The Role of the Immune System in the Generation of Neuropathic Pain.." *Lancet Neurology* 11 (7) (July): 629–642. doi:10.1016/S1474-4422(12)70134-5.

Campbell, J N, A I Basbaum, A Dray, and R Dubner. 2006. "Emerging Strategies for the Treatment of Neuropathic Pain CAMPBELL James N., BASBAUM Allen I., DREY André, DUBNER Ronald, DWORKIN Robert H., SANG Christine N.: Librairie Lavoisier."

Campbell, James N, and Richard A Meyer. 2006. "Mechanisms of Neuropathic Pain." *Neuron* 52 (1) (October 5): 77–92. doi:10.1016/j.neuron.2006.09.021.

Carlton, S M, H A Lekan, S H Kim, and J M Chung. 1994. "Behavioral Manifestations of an Experimental Model for Peripheral Neuropathy Produced by Spinal Nerve Ligation in the Primate." *Pain* 56 (2) (February 1): 155–166.

Carraway, R, and S E Leeman. 1973. "The Isolation of a New Hypotensive Peptide,

Neurotensin, From Bovine Hypothalami..” *The Journal of Biological Chemistry* 248 (19) (October 10): 6854–6861.

Castanotto, Daniela, and John J Rossi. 2009. “The Promises and Pitfalls of RNA-Interference-Based Therapeutics.” *Nature* 457 (7228) (January 22): 426–433. doi:10.1038/nature07758.

Cavelier, Florine, Bertrand Vivet, Jean Martinez, André Aubry, Claude Didierjean, André Vicherat, and Michel Marraud. 2002. “Influence of Silaproline on Peptide Conformation and Bioactivity..” *Journal of the American Chemical Society* 124 (12) (March 27): 2917–2923.

Chalon, P, N Vita, M Kaghad, M Guillemot, J Bonnin, B Delpech, G Le Fur, P Ferrara, and D Caput. 1996. “Molecular Cloning of a Levocabastine-Sensitive Neurotensin Binding Site..” *FEBS Letters* 386 (2-3) (May 20): 91–94.

Chapman, C Richard, Robert P Tuckett, and Chan Woo Song. 2008. “Pain and Stress in a Systems Perspective: Reciprocal Neural, Endocrine, and Immune Interactions.” *The Journal of Pain : Official Journal of the American Pain Society* 9 (2) (February 1): 122–145. doi:10.1016/j.jpain.2007.09.006.

Chernov, H I, D E Wilson, W F Fowler, and A J Plummer. 1967. “Non-Specificity of the Mouse Writhing Test..” *Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Thérapie* 167 (1) (May): 171–178.

Ché, Christian, Gaoqiang Yang, Carine Thiot, Marie-Claude Lacoste, Jean-Christophe Currie, Michel Demeule, Anthony Régina, Richard Béliveau, and Jean Paul Castaigne. 2010. “New Angiopep-Modified Doxorubicin (ANG1007) and Etoposide (ANG1009) Chemotherapeutics with Increased Brain Penetration..” *Journal of Medicinal Chemistry* 53 (7) (April 8): 2814–2824. doi:10.1021/jm9016637.

Christoph, Thomas, Arnold Grünweller, Joanna Mika, Martin K-H Schäfer, Erik J Wade, Eberhard Weihe, Volker A Erdmann, Robert Frank, Clemens Gillen, and Jens Kurreck. 2006. “Silencing of Vanilloid Receptor TRPV1 by RNAi Reduces Neuropathic and Visceral Pain in Vivo..” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 350 (1) (November 10): 238–243. doi:10.1016/j.bbrc.2006.09.037.

Chrubasik, J, S Chrubasik, and E Martin. 1993. “Non-Opioid Peptides for Analgesia..” *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 53 (1): 289–296.

Clarke, Collin F M, and Keith St Lawrence. 2013. “Functional Imaging for Interpretation of Pain Pathways: Current Clinical Application/Relevance and Future Initiatives..” *Current Pain and Headache Reports* 17 (2) (February): 311. doi:10.1007/s11916-012-0311-x.

Clineschmidt, B V, and J C McGuffin. 1977. “Neurotensin Administered Intracisternally Inhibits Responsiveness of Mice to Noxious Stimuli..” *European Journal of Pharmacology* 46 (4) (December 15): 395–396.

Clineschmidt, B V, G E Martin, and D F Veber. 1982. “Antinocisponsive Effects of Neurotensin and Neurotensin-Related Peptides..” *Annals of the New York Academy of Sciences* 400: 283–306.

Clineschmidt, B V, J C McGuffin, and P B Bunting. 1979. “Neurotensin: Antinocisponsive Action in Rodents..” *European Journal of Pharmacology* 54 (1-2) (February 15): 129–139.

Cobos, Enrique J, Nader Ghasemlou, Dionéia Araldi, David Segal, Kelly Duong, and Clifford J Woolf. 2012. “Inflammation-Induced Decrease in Voluntary Wheel Running in Mice: a Nonreflexive Test for Evaluating Inflammatory Pain and Analgesia..” *Pain*

153 (4) (April): 876–884. doi:10.1016/j.pain.2012.01.016.
Collingwood, Michael A, Scott D Rose, Lingyan Huang, Chris Hillier, Mohammad Amarzguioui, Merete T Wiiger, Harris S Soifer, John J Rossi, and Mark A Behlke. 2008. "Chemical Modification Patterns Compatible with High Potency Dicer-Substrate Small Interfering RNAs." *Oligonucleotides* 18 (2) (June 1): 187–200. doi:10.1089/oli.2008.0123.
Combe, Rachel, Steve Bramwell, and Mark J Field. 2004. "The Monosodium Iodoacetate Model of Osteoarthritis: a Model of Chronic Nociceptive Pain in Rats?." *Neuroscience Letters* 370 (2-3) (November 11): 236–240. doi:10.1016/j.neulet.2004.08.023.
Cooper, P E, M H Fernstrom, O P Rorstad, S E Leeman, and J B Martin. 1981. "The Regional Distribution of Somatostatin, Substance P and Neurotensin in Human Brain.." *Brain Research* 218 (1-2) (August 10): 219–232.
Coquerel, A, I Dubuc, J F Menard, P Kitabgi, and J Costentin. 1986. "Naloxone-Insensitive Potentiation of Neurotensin Hypothermic Effect by the Enkephalinase Inhibitor Thiorphan.." *Brain Research* 398 (2) (November 29): 386–389.
Costigan, Michael, Joachim Scholz, and Clifford J Woolf. 2009. "Neuropathic Pain: a Maladaptive Response of the Nervous System to Damage.." *Annual Review of Neuroscience* 32: 1–32. doi:10.1146/annurev.neuro.051508.135531.
Courtney, Carol A, and César Fernández-de-Las-Peñas. 2011. "Identifying the Cut-Point: the Transition From Acute to Chronic Musculoskeletal Pain.." *The Journal of Manual & Manipulative Therapy* 19 (4) (November): 185. doi:10.1179/106698111X13129729551868.
Coutaux, Anne, Frédéric Adam, Jean-Claude Willer, and Daniel Le Bars. 2005. "Hyperalgesia and Allodynia: Peripheral Mechanisms.." *Joint, Bone, Spine : Revue Du Rhumatisme* 72 (5) (October): 359–371. doi:10.1016/j.jbspin.2004.01.010.
D'amour, Fred E, and Donn L Smith. 1941. "A Method for Determining Loss of Pain Sensation." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (72) (May 1): 74–79.
D'Mello, Richard, Fabien Marchand, Sophie Pezet, Stephen B McMahon, and Anthony H Dickenson. 2011. "Perturbing PSD-95 Interactions with NR2B-Subtype Receptors Attenuates Spinal Nociceptive Plasticity and Neuropathic Pain.." *Molecular Therapy : the Journal of the American Society of Gene Therapy* 19 (10) (October): 1780–1792. doi:10.1038/mt.2011.42.
Davoody, Leyla, Raimi L Quiton, Jessica M Lucas, Yadong Ji, Asaf Keller, and Radi Masri. 2011. "Conditioned Place Preference Reveals Tonic Pain in an Animal Model of Central Pain.." *The Journal of Pain : Official Journal of the American Pain Society* 12 (8) (August): 868–874. doi:10.1016/j.jpain.2011.01.010.
de Leon-Casasola, Oscar A. 2013. "Opioids for Chronic Pain: New Evidence, New Strategies, Safe Prescribing.." *The American Journal of Medicine* 126 (3 Suppl 1) (March): S3–11. doi:10.1016/j.amjmed.2012.11.011.
De Vry, Jean, Ellen Kuhl, Petra Franken-Kunkel, and Gisela Eckel. 2004. "Pharmacological Characterization of the Chronic Constriction Injury Model of Neuropathic Pain.." *European Journal of Pharmacology* 491 (2-3) (May 3): 137–148. doi:10.1016/j.ejphar.2004.03.051.
Decosterd, I, and C J Woolf. 2000. "Spared Nerve Injury: an Animal Model of Persistent Peripheral Neuropathic Pain." *Pain* 87 (2) (August 1): 149–158.
Delaney, A, S M Fleetwood-Walker, L A Colvin, and M Fallon. 2008. "Translational

Medicine: Cancer Pain Mechanisms and Management..” *British Journal of Anaesthesia* 101 (1) (July): 87–94. doi:10.1093/bja/aen100.

DeLeo, J A, D W Coombs, S Willenbring, R W Colburn, C Fromm, R Wagner, and B B Twitchell. 1994. “Characterization of a Neuropathic Pain Model: Sciatic Cryoneurolysis in the Rat.” *Pain* 56 (1): 9–16.

Demeule, Michel, Jean-Christophe Currie, Yanick Bertrand, Christian Ché, Tran Nguyen, Anthony Régina, Reinhard Gabathuler, Jean Paul Castaigne, and Richard Béliveau. 2008. “Involvement of the Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein in the Transcytosis of the Brain Delivery Vector Angiopep-2..” *Journal of Neurochemistry* 106 (4) (August): 1534–1544. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05492.x.

Descartes, René, Florentius 1619-1669 Schuyl, Louis de fl 1661-1677 La Forge, and Claude 1614-1684 ed Clerselier. 1664. “L‘Homme De René Descartes. Et Vn Traitté De La Formation Dv Foetvs, Dv Mesme Avthevr. Auec Les Remarques De Lovys De La Forge, Docteur en Medecine, Demeurant À La Fleche, Sur Le Traitté De L’Homme De René Descartes; & Sur Les Figures Par Luy Inuentées.” (May 4).

Deumens, Ronald, Arnaud Steyaert, Patrice Forget, Michael Schubert, Patricia Lavand'homme, Emmanuel Hermans, and Marc De Kock. 2013. “Prevention of Chronic Postoperative Pain: Cellular, Molecular, and Clinical Insights for Mechanism-Based Treatment Approaches..” *Progress in Neurobiology* 104 (May): 1–37. doi:10.1016/j.pneurobio.2013.01.002.

Devor, M. 1991. “Sensory Basis of Autotomy in Rats..” *Pain* 45 (2) (May): 109–110.

Devor, M. 2009. “Ectopic Discharge in Abeta Afferents as a Source of Neuropathic Pain.” *Experimental Brain Research Experimentelle Hirnforschung Expérimentation Cérébrale* (February 26). doi:10.1007/s00221-009-1724-6.

Devulder, J, U Richarz, and S H Nataraja. 2005. “Impact of Long-Term Use of Opioids on Quality of Life in Patients with Chronic, Non-Malignant Pain..” *Current Medical Research and Opinion* 21 (10) (October): 1555–1568. doi:10.1185/030079905X65321.

Ding, Hoi-Ki, Fanny W F Shum, Shanelle W Ko, and Min Zhuo. 2005. “A New Assay of Thermal-Based Avoidance Test in Freely Moving Mice..” *The Journal of Pain : Official Journal of the American Pain Society* 6 (7) (July): 411–416. doi:10.1016/j.jpain.2005.01.361.

Djouhri, Laiche, Stella Koutsikou, Xin Fang, Simon McMullan, and Sally N Lawson. 2006. “Spontaneous Pain, Both Neuropathic and Inflammatory, Is Related to Frequency of Spontaneous Firing in Intact C-Fiber Nociceptors.” *Journal of Neuroscience* 26 (4) (January 25): 1281–1292. doi:10.1523/JNEUROSCI.3388-05.2006.

Dobner, P R. 2005. “Multitasking with Neurotensin in the Central Nervous System..” *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 62 (17) (September): 1946–1963. doi:10.1007/s00018-005-5128-x.

Dobner, Paul R. 2006. “Neurotensin and Pain Modulation.” *Peptides* 27 (10) (October 1): 2405–2414. doi:10.1016/j.peptides.2006.04.025.

Doré-Savard, Louis, David A Barrière, Elora Midavaine, Danny Bélanger, Nicolas Beaudet, Luc Tremblay, Jean-François Beaudoin, et al. 2013. “Mammary Cancer Bone Metastasis Follow-Up Using Multimodal Small-Animal MR and PET Imaging..” *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine* (April 17). doi:10.2967/jnumed.112.114215.

Doré-Savard, Louis, Geneviève Roussy, Marc-André Dansereau, Michael A Collingwood, Kim A Lennox, Scott D Rose, Nicolas Beaudet, Mark A Behlke, and Philippe Sarret.

2008. “Central Delivery of Dicer-Substrate siRNA: a Direct Application for Pain Research..” *Molecular Therapy : the Journal of the American Society of Gene Therapy* 16 (7) (July): 1331–1339. doi:10.1038/mt.2008.98.

Doré-Savard, Louis, Nicolas Beaudet, Luc Tremblay, Yongjun Xiao, Martin Lepage, and Philippe Sarret. 2012. “A Micro-Imaging Study Linking Bone Cancer Pain with Tumor Growth and Bone Resorption in a Rat Model..” *Clinical & Experimental Metastasis* (September 6). doi:10.1007/s10585-012-9530-0.

Doré-Savard, Louis, Valérie Otis, Karine Belleville, Myriam Lemire, Mélanie Archambault, Luc Tremblay, Jean-François Beaudoin, et al. 2010. “Behavioral, Medical Imaging and Histopathological Features of a New Rat Model of Bone Cancer Pain..” *PloS One* 5 (10): e13774. doi:10.1371/journal.pone.0013774.

Dorn, Gabriele, Sadhana Patel, Glen Wotherspoon, Maja Hemmings-Mieszczak, Jane Barclay, Francois J C Natt, Pierre Martin, et al. 2004. “siRNA Relieves Chronic Neuropathic Pain.” *Nucleic Acids Research* 32 (5): e49. doi:10.1093/nar/gnh044.

Dowdall, Tom, Ian Robinson, and Theo F Meert. 2005. “Comparison of Five Different Rat Models of Peripheral Nerve Injury..” *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 80 (1) (January): 93–108. doi:10.1016/j.pbb.2004.10.016.

Dray, A. 2008. “Neuropathic Pain: Emerging Treatments.” *British Journal of Anaesthesia* 101 (1) (July 1): 48–58. doi:10.1093/bja/aen107.

Dubuc, I, J Costentin, J P Terranova, M C Barnouin, P Soubrié, G Le Fur, W Rostène, and P Kitabgi. 1994. “The Nonpeptide Neurotensin Antagonist, SR 48692, Used as a Tool to Reveal Putative Neurotensin Receptor Subtypes..” *British Journal of Pharmacology* 112 (2) (June): 352–354.

Dubuc, I, J Costentin, S Doulut, M Rodriguez, J Martinez, and P Kitabgi. 1992. “JMV 449: a Pseudopeptide Analogue of Neurotensin-(8-13) with Highly Potent and Long-Lasting Hypothermic and Analgesic Effects in the Mouse..” *European Journal of Pharmacology* 219 (2) (August 25): 327–329.

Dubuc, I, P Sarret, C Labbé-Jullié, J M Botto, E Honoré, E Bourdel, J Martinez, et al. 1999. “Identification of the Receptor Subtype Involved in the Analgesic Effect of Neurotensin..” *Journal of Neuroscience* 19 (1) (January 1): 503–510.

Dubuc, I, S Remande, and J Costentin. 1999. “The Partial Agonist Properties of Levocabastine in Neurotensin-Induced Analgesia.” *European Journal of Pharmacology* 381 (1) (September 17): 9–12.

Dubuisson, D, and S G Dennis. 1977. “The Formalin Test: a Quantitative Study of the Analgesic Effects of Morphine, Meperidine, and Brain Stem Stimulation in Rats and Cats..” *Pain* 4 (2) (December): 161–174.

Eid, Samer R, Eric D Crown, Eric L Moore, Hongyu A Liang, Kar-Chan Choong, Shelley Dima, Darrell A Henze, Stefanie A Kane, and Mark O Urban. 2008. “HC-030031, a TRPA1 Selective Antagonist, Attenuates Inflammatory- and Neuropathy-Induced Mechanical Hypersensitivity..” *Molecular Pain* 4: 48. doi:10.1186/1744-8069-4-48.

Emson, P C, P M Horsfield, M Goedert, M N Rossor, and C H Hawkes. 1985. “Neurotensin in Human Brain: Regional Distribution and Effects of Neurological Illness..” *Brain Research* 347 (2) (November 18): 239–244.

Fan, Yi, Margaret H Lai, Kelly Sullivan, Michael Popiolek, Terrance H Andree, Paul Dollings, and Mark H Pausch. 2008. “The Identification of Neurotensin NTS1 Receptor Partial Agonists Through a Ligand-Based Virtual Screening Approach..” *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18 (21) (November 1): 5789–5791.

doi:10.1016/j.bmcl.2008.09.075.
Feifel, D, T L Reza, D J Wustrow, and M D Davis. 1999. "Novel Antipsychotic-Like Effects on Prepulse Inhibition of Startle Produced by a Neurotensin Agonist.." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 288 (2) (February): 710–713.
Ferland, C E, S Laverty, F Beaudry, and P Vachon. 2011. "Gait Analysis and Pain Response of Two Rodent Models of Osteoarthritis.." *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 97 (3) (January): 603–610. doi:10.1016/j.pbb.2010.11.003.
Fernihough, Janet, Clive Gentry, Marzia Malcangio, Alyson Fox, John Rediske, Theodore Pellas, Bruce Kidd, Stuart Bevan, and Janet Winter. 2004. "Pain Related Behaviour in Two Models of Osteoarthritis in the Rat Knee.." *Pain* 112 (1-2) (November): 83–93. doi:10.1016/j.pain.2004.08.004.
Ferraro, Luca, Maria Cristina Tomasini, Roberta Mazza, Kjell Fuxe, Jacqueline Fournier, Sergio Tanganelli, and Tiziana Antonelli. 2008. "Neurotensin Receptors as Modulators of Glutamatergic Transmission.." *Brain Research Reviews* 58 (2) (August): 365–373. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.11.001.
Field, Mark J, M Isabel Gonzalez, Ronald J Tallarida, and Lakhbir Singh. 2002. "Gabapentin and the Neurokinin(1) Receptor Antagonist CI-1021 Act Synergistically in Two Rat Models of Neuropathic Pain.." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 303 (2) (November): 730–735. doi:10.1124/jpet.102.033134.
Fire, A, S Xu, M K Montgomery, S A Kostas, S E Driver, and C C Mello. 1998. "Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in Caenorhabditis Elegans." *Nature* 391 (6669) (February 19): 806–811. doi:10.1038/35888.
Frey, P, M Lis, and D M Coward. 1988. "Neurotensin Concentrations in Rat Striatum and Nucleus Accumbens: Further Studies of Their Regulation.." *Neurochemistry International* 12 (1): 33–38.
Frischenschlager, Oskar, and I Pucher. 2002. "Psychological Management of Pain.." *Disability and Rehabilitation* 24 (8) (May 20): 416–422. doi:10.1080/09638280110108841.
Fu, Yu, Jeong Han, Titilope Ishola, Michelle Scerbo, Hita Adwanikar, Cara Ramsey, and Volker Neugebauer. 2008. "PKA and ERK, but Not PKC, in the Amygdala Contribute to Pain-Related Synaptic Plasticity and Behavior.." *Molecular Pain* 4: 26. doi:10.1186/1744-8069-4-26.
Fukawa, K, O Kawano, M Hibi, N Misaki, S Ohba, and Y Hatanaka. 1980. "A Method for Evaluating Analgesic Agents in Rats.." *Journal of Pharmacological Methods* 4 (3) (November): 251–259.
Gabathuler, Reinhard. 2012. "[New Protein Vectors for Physiological Transfer of Therapeutic Agents to the Central Nervous System].." *Biologie Aujourd'hui* 206 (3): 191–203. doi:10.1051/jbio/2012018.
Gabriel, Anne F, Marco A E Marcus, Geert H I M Walenkamp, and Elbert A J Joosten. 2009. "The CatWalk Method: Assessment of Mechanical Allodynia in Experimental Chronic Pain.." *Behavioural Brain Research* 198 (2) (March 17): 477–480. doi:10.1016/j.bbr.2008.12.018.
Galluzzi, Katherine E. 2007. "Managing Neuropathic Pain." *The Journal of the American Osteopathic Association* 107 (10 Suppl 6) (November 1): ES39–48.
Genc, Sermin, Tolga F Koroglu, and Kursad Genc. 2004. "RNA Interference in Neuroscience." *Brain Research Molecular Brain Research* 132 (2) (December 20):

260–270. doi:10.1016/j.molbrainres.2004.02.004.

Gendron, Louis, Amélie Perron, Marcel Daniel Payet, Nicole Gallo-Payet, Philippe Sarret, and Alain Beaudet. 2004. "Low-Affinity Neurotensin Receptor (NTS2) Signaling: Internalization-Dependent Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinases 1/2." *Molecular Pharmacology* 66 (6) (December 1): 1421–1430. doi:10.1124/mol.104.002303.

Goss, James R, William F Goins, and Joseph C Glorioso. 2007. "Gene Therapy Applications for the Treatment of Neuropathic Pain.." *Expert Review of Neurotherapeutics* 7 (5) (May): 487–506. doi:10.1586/14737175.7.5.487.

Goyal, Bhoomika R, Mayur M Patel, Mithil K Soni, and Shraddha V Bhadada. 2009. "Therapeutic Opportunities of Small Interfering RNA.." *Fundamental & Clinical Pharmacology* 23 (4) (August): 367–386. doi:10.1111/j.1472-8206.2009.00694.x.

Granier, C, J Van Rietschoten, P Kitabgi, C Poustis, and P Freychet. 1982. "Synthesis and Characterization of Neurotensin Analogues for Structure/Activity Relationship Studies. Acetyl-Neurotensin-(8--13) Is the Shortest Analogue with Full Binding and Pharmacological Activities.." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 124 (1) (May): 117–124.

Grimm, Dirk. 2009. "Small Silencing RNAs: State-of-the-Art." *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (9) (July 25): 672–703. doi:10.1016/j.addr.2009.05.002.

Grimm, Dirk, and Mark A Kay. 2007. "RNAi and Gene Therapy: a Mutual Attraction." *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*: 473–481. doi:10.1182/asheducation-2007.1.473.

Guillemette, A, M A Dansereau, N Beaudet, E Richelson, and P Sarret. 2012. "Intrathecal Administration of NTS1 Agonists Reverses Nociceptive Behaviors in a Rat Model of Neuropathic Pain.." *European Journal of Pain (London, England)* 16 (4) (April): 473–484. doi:10.1016/j.ejpain.2011.07.008.

Gully, D, F Jeanjean, M Poncelet, R Steinberg, P Soubrié, G Le Fur, and J P Maffrand. 1995. "Neuropharmacological Profile of Non-Peptide Neurotensin Antagonists.." *Fundamental & Clinical Pharmacology* 9 (6): 513–521.

Hanson, G R, A J Hoonakker, M E Alburges, L M McFadden, C M Robson, and P S Frankel. 2012. "Response of Limbic Neurotensin Systems to Methamphetamine Self-Administration.." *Neuroscience* 203 (February 17): 99–107. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.12.037.

Hay, C H, M A Trevethick, A Wheeldon, J S Bowers, and J S de Belleroche. 1997. "The Potential Role of Spinal Cord Cyclooxygenase-2 in the Development of Freund's Complete Adjuvant-Induced Changes in Hyperalgesia and Allodynia.." *Neuroscience* 78 (3) (June): 843–850.

He, Ying, Xuebi Tian, Xiaoyu Hu, Frank Porreca, and Zaijie Jim Wang. 2012. "Negative Reinforcement Reveals Non-Evoked Ongoing Pain in Mice with Tissue or Nerve Injury.." *The Journal of Pain : Official Journal of the American Pain Society* 13 (6) (June): 598–607. doi:10.1016/j.jpain.2012.03.011.

Hehn, von, Christian A, Ralf Baron, and Clifford J Woolf. 2012. "Deconstructing the Neuropathic Pain Phenotype to Reveal Neural Mechanisms.." *Neuron* 73 (4) (February 23): 638–652. doi:10.1016/j.neuron.2012.02.008.

Herbert, M K, and P Holzer. 2002. "[Why Are Substance P(NK1)-Receptor Antagonists Ineffective in Pain Treatment?].." *Der Anaesthesist* 51 (4) (April): 308–319.

Hill, Ray. 2000. "NK1 (Substance P) Receptor Antagonists – Why Are They Not Analgesic in Humans?." *Trends in Pharmacological Sciences* 21 (7) (July): 244–246. doi:10.1016/S0165-6147(00)01502-9.

Honore, P, S D Rogers, M J Schwei, J L Salak-Johnson, N M Luger, M C Sabino, D R Clohisy, and P W Mantyh. 2000. "Murine Models of Inflammatory, Neuropathic and Cancer Pain Each Generates a Unique Set of Neurochemical Changes in the Spinal Cord and Sensory Neurons.." *Neuroscience* 98 (3): 585–598.

Hu, Hui-Juan, and Robert W Gereau. 2011. "Metabotropic Glutamate Receptor 5 Regulates Excitability and Kv4.2-Containing $K^+$ Channels Primarily in Excitatory Neurons of the Spinal Dorsal Horn.." *Journal of Neurophysiology* 105 (6) (June): 3010–3021. doi:10.1152/jn.01050.2010.

Huang, Jiehong, Xuming Zhang, and Peter A McNaughton. 2006. "Modulation of Temperature-Sensitive TRP Channels.." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 17 (6) (December): 638–645. doi:10.1016/j.semcdb.2006.11.002.

Hudson, L J, S Bevan, G Wotherspoon, C Gentry, A Fox, and J Winter. 2001. "VR1 Protein Expression Increases in Undamaged DRG Neurons After Partial Nerve Injury.." *The European Journal of Neuroscience* 13 (11) (June): 2105–2114.

Hughes, Francis M, Brooke E Shaner, Lisa A May, Lyndsay Zotian, Justin O Brower, R Jeremy Woods, Michael Cash, et al. 2010. "Identification and Functional Characterization of a Stable, Centrally Active Derivative of the Neurotensin (8-13) Fragment as a Potential First-in-Class Analgesic.." *Journal of Medicinal Chemistry* 53 (12) (June 24): 4623–4632. doi:10.1021/jm100092s.

Huntoon, Marc A, and Abram H Burgher. 2009. "Ultrasound-Guided Permanent Implantation of Peripheral Nerve Stimulation (PNS) System for Neuropathic Pain of the Extremities: Original Cases and Outcomes." *Pain Medicine* 10 (8) (November 1): 1369–1377. doi:10.1111/j.1526-4637.2009.00745.x.

Hwang, Jae Ryoung, Min Woo Baek, Jeonggu Sim, Heung-Sik Choi, Ji Man Han, You Lim Kim, Jong-Ik Hwang, et al. 2010. "Intermolecular Cross-Talk Between NTR1 and NTR2 Neurotensin Receptor Promotes Intracellular Sequestration and Functional Inhibition of NTR1 Receptors.." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 391 (1) (January 1): 1007–1013. doi:10.1016/j.bbrc.2009.12.007.

Ichim, Thomas E, Mu Li, Hua Qian, Igor A Popov, Katarzyna Rycerz, Xiufen Zheng, David White, Robert Zhong, and Wei-Ping Min. 2004. "RNA Interference: a Potent Tool for Gene-Specific Therapeutics.." *American Journal of Transplantation : Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 4 (8) (August): 1227–1236. doi:10.1111/j.1600-6143.2004.00530.x.

Jackson, Aimee L, Steven R Bartz, Janell Schelter, Sumire V Kobayashi, Julja Burchard, Mao Mao, Bin Li, Guy Cavet, and Peter S Linsley. 2003. "Expression Profiling Reveals Off-Target Gene Regulation by RNAi." *Nature Biotechnology* 21 (6) (June 1): 635–637. doi:10.1038/nbt831.

Jacobsen, L, P Madsen, C Jacobsen, M S Nielsen, J Gliemann, and C M Petersen. 2001. "Activation and Functional Characterization of the Mosaic Receptor SorLA/LR11.." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (25) (June 22): 22788–22796. doi:10.1074/jbc.M100857200.

Jaggi, Amteshwar Singh, Vivek Jain, and Nirmal Singh. 2009. "Animal Models of Neuropathic Pain." *Fundamental & Clinical Pharmacology* (December 17).

doi:10.1111/j.1472-8206.2009.00801.x.
Jain, K K. 2008. "Gene Therapy for Pain." *Expert Opinion on Biological Therapy* 8 (12) (December): 1855–1866. doi:10.1517/14712590802496977.
Jensen, Mark P, Joseph Barber, Marisol A Hanley, Joyce M Engel, Joan M Romano, Diana D Cardenas, George H Kraft, Amy J Hoffman, and David R Patterson. 2008. "Long-Term Outcome of Hypnotic-Analgesia Treatment for Chronic Pain in Persons with Disabilities.." *The International Journal of Clinical and Experimental Hypnosis* 56 (2) (April): 156–169. doi:10.1080/00207140701849486.
Jensen, Mark P, Marisol A Hanley, Joyce M Engel, Joan M Romano, Joseph Barber, Diana D Cardenas, George H Kraft, Amy J Hoffman, and David R Patterson. 2005. "Hypnotic Analgesia for Chronic Pain in Persons with Disabilities: a Case Series.." *The International Journal of Clinical and Experimental Hypnosis* 53 (2) (April): 198–228. doi:10.1080/00207140590927545.
Jirkof, Paulin, Nikola Cesarovic, Andreas Rettich, Flora Nicholls, Burkhardt Seifert, and Margarete Arras. 2010. "Burrowing Behavior as an Indicator of Post-Laparotomy Pain in Mice.." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 4: 165. doi:10.3389/fnbeh.2010.00165.
Johansen, J P, H L Fields, and B H Manning. 2001. "The Affective Component of Pain in Rodents: Direct Evidence for a Contribution of the Anterior Cingulate Cortex.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (14) (July 3): 8077–8082. doi:10.1073/pnas.141218998.
Jourdan, D, D Ardid, and A Eschalier. 2002. "Analysis of Ultrasonic Vocalisation Does Not Allow Chronic Pain to Be Evaluated in Rats." *Pain*.
Julius, D, and A I Basbaum. 2001. "Molecular Mechanisms of Nociception." *Nature* 413 (6852) (September 13): 203–210. doi:10.1038/35093019.
Kaiser, Peter K, R C Andrew Symons, Syed Mahmood Shah, Edward J Quinlan, Homayoun Tabandeh, Diana V Do, Gail Reisen, et al. 2010. "RNAi-Based Treatment for Neovascular Age-Related Macular Degeneration by Sirna-027.." *American Journal of Ophthalmology* 150 (1) (July): 33–39.e2. doi:10.1016/j.ajo.2010.02.006.
Katano, Tayo, Takanobu Nakazawa, Terumasa Nakatsuka, Masahiko Watanabe, Tadashi Yamamoto, and Seiji Ito. 2011. "Involvement of Spinal Phosphorylation Cascade of Tyr1472-NR2B, Thr286-CaMKII, and Ser831-GluR1 in Neuropathic Pain.." *Neuropharmacology* 60 (4) (March): 609–616. doi:10.1016/j.neuropharm.2010.12.005.
Kaur, Indu Pal, and Gaurav Sharma. 2012. "siRNA: a New Approach to Target Neuropathic Pain.." *BioDrugs : Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy* 26 (6) (December 1): 401–412. doi:10.2165/11634380-000000000-00000.
Kawasaki, Yasuhiko, Zhen-Zhong Xu, Xiaoying Wang, Jong-Yeon Park, Zhi-Ye Zhuang, Ping-Heng Tan, Yong-Jing Gao, et al. 2008. "Distinct Roles of Matrix Metalloproteases in the Early- and Late-Phase Development of Neuropathic Pain." *Nature Medicine* 14 (3) (February 10): 331–336. doi:10.1038/nm1723.
Kawasaki-Yatsugi, S, Y Nagakura, S Ogino, T Sekizawa, T Kiso, M Takahashi, G Ishikawa, H Ito, and Y Shimizu. 2012. "Automated Measurement of Spontaneous Pain-Associated Limb Movement and Drug Efficacy Evaluation in a Rat Model of Neuropathic Pain.." *European Journal of Pain (London, England)* 16 (10) (November): 1426–1436. doi:10.1002/j.1532-2149.2012.00142.x.
Kennedy, Jeffrey D. 2007. "Neuropathic Pain: Molecular Complexity Underlies Continuing

Unmet Medical Need." *Journal of Medicinal Chemistry* 50 (11) (May 31): 2547–2556. doi:10.1021/jm061023c.

Kim, Dong-Ho, Mark A Behlke, Scott D Rose, Mi-Sook Chang, Sangdun Choi, and John J Rossi. 2005. "Synthetic dsRNA Dicer Substrates Enhance RNAi Potency and Efficacy." *Nature Biotechnology* 23 (2) (February 1): 222–226. doi:10.1038/nbt1051.

Kim, Hyun Yeong, Chul-Kyu Park, Ik-Hyun Cho, Sung Jun Jung, Joong Soo Kim, and Seog Bae Oh. 2008. "Differential Changes in TRPV1 Expression After Trigeminal Sensory Nerve Injury.." *The Journal of Pain : Official Journal of the American Pain Society* 9 (3) (March): 280–288. doi:10.1016/j.jpain.2007.11.013.

Kim, Hyun-Ki, Enkhzaya Davaa, Chang-Seon Myung, and Jeong-Sook Park. 2010. "Enhanced siRNA Delivery Using Cationic Liposomes with New Polyarginine-Conjugated PEG-Lipid.." *International Journal of Pharmaceutics* 392 (1-2) (June 15): 141–147. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.03.047.

Kim, S H, and J M Chung. 1992. "An Experimental Model for Peripheral Neuropathy Produced by Segmental Spinal Nerve Ligation in the Rat." *Pain* 50 (3) (September 1): 355–363.

King, Tamara, Louis Vera-Portocarrero, Tannia Gutierrez, Todd W Vanderah, Gregory Dussor, Josephine Lai, Howard L Fields, and Frank Porreca. 2009. "Unmasking the Tonic-Aversive State in Neuropathic Pain.." *Nature Neuroscience* 12 (11) (November): 1364–1366. doi:10.1038/nn.2407.

King, Tamara, Srinivas Rao, Todd Vanderah, Qingmin Chen, Anna Vardanyan, and Frank Porreca. 2006. "Differential Blockade of Nerve Injury-Induced Shift in Weight Bearing and Thermal and Tactile Hypersensitivity by Milnacipran.." *The Journal of Pain : Official Journal of the American Pain Society* 7 (7) (July): 513–520. doi:10.1016/j.jpain.2006.02.001.

Kirou-Mauro, Andrea M, Amanda Hird, Jennifer Wong, Emily Sinclair, Elizabeth A Barnes, May Tsao, Cyril Danjoux, and Edward Chow. 2009. "Has Pain Management in Cancer Patients with Bone Metastases Improved? a Seven-Year Review at an Outpatient Palliative Radiotherapy Clinic.." *Journal of Pain and Symptom Management* 37 (1) (January): 77–84. doi:10.1016/j.jpainsymman.2007.12.014.

Kissin, Igor. 2010. "The Development of New Analgesics Over the Past 50 Years: a Lack of Real Breakthrough Drugs.." *Anesthesia and Analgesia* 110 (3) (March 1): 780–789. doi:10.1213/ANE.0b013e3181cde882.

Kitabgi, P, F de Nadai, C Rovère, and J N Bidard. 1992. "Biosynthesis, Maturation, Release, and Degradation of Neurotensin and Neuromedin N.." *Annals of the New York Academy of Sciences* 668: 30–42.

Kitabgi, P, W Rostène, M Dussaillant, A Schotte, P M Laduron, and J P Vincent. 1987. "Two Populations of Neurotensin Binding Sites in Murine Brain: Discrimination by the Antihistamine Levocabastine Reveals Markedly Different Radioautographic Distribution.." *European Journal of Pharmacology* 140 (3) (August 21): 285–293.

Kleczkowska, Patrycja, Andrzej W Lipkowski, Dirk Tourwé, and Steven Ballet. 2013. "Hybrid Opioid/Non-Opioid Ligands in Pain Research.." *Current Pharmaceutical Design* (February 20).

Kleczkowska, Patrycja, Piotr Kosson, Steven Ballet, Isabelle Van Den Eynde, Yuko Tsuda, Dirk Tourwé, and Andrzej W Lipkowski. 2010. "PK20, a New Opioid-Neurotensin Hybrid Peptide That Exhibits Central and Peripheral Antinociceptive Effects.." *Molecular Pain* 6: 86. doi:10.1186/1744-8069-6-86.

Klusakova, Ilona, and Petr Dubovy. 2009. "Experimental Models of Peripheral Neuropathic Pain Based on Traumatic Nerve Injuries - an Anatomical Perspective.." *Annals of Anatomy = Anatomischer Anzeiger : Official Organ of the Anatomische Gesellschaft* 191 (3) (June): 248–259. doi:10.1016/j.aanat.2009.02.007.

Kokko, Kyle P, M Kyle Hadden, Kimber L Price, Kevin S Orwig, Ronald E See, and Thomas A Dix. 2005. "In Vivo Behavioral Effects of Stable, Receptor-Selective Neurotensin[8-13] Analogues That Cross the Blood-Brain Barrier.." *Neuropharmacology* 48 (3) (March): 417–425. doi:10.1016/j.neuropharm.2004.10.008.

Koplovitch, Pini, Anne Minert, and Marshall Devor. 2012. "Spontaneous Pain in Partial Nerve Injury Models of Neuropathy and the Role of Nociceptive Sensory Cover.." *Experimental Neurology* 236 (1) (July): 103–111. doi:10.1016/j.expneurol.2012.04.005.

Krenz, N R, and L C Weaver. 1998. "Sprouting of Primary Afferent Fibers After Spinal Cord Transection in the Rat.." *Neuroscience* 85 (2) (July): 443–458.

Kumar, Naresh, Andre Laferriere, Jonathan S C Yu, Amelia Leavitt, and Terence J Coderre. 2010. "Evidence That Pregabalin Reduces Neuropathic Pain by Inhibiting the Spinal Release of Glutamate." *Journal of Neurochemistry* 113 (2) (April 1): 552–561. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06625.x.

Kumar, Priti, Haoquan Wu, Jodi L McBride, Kyeong-Eun Jung, Moon Hee Kim, Beverly L Davidson, Sang Kyung Lee, Premlata Shankar, and N Manjunath. 2007. "Transvascular Delivery of Small Interfering RNA to the Central Nervous System.." *Nature* 448 (7149) (July 5): 39–43. doi:10.1038/nature05901.

Kurreck, Jens. 2009. "RNA Interference: From Basic Research to Therapeutic Applications." *Angewandte Chemie (International Ed in English)* 48 (8): 1378–1398. doi:10.1002/anie.200802092.

Labbé-Jullié, C, I Dubuc, A Brouard, S Doulut, E Bourdel, D Pelaprat, J Mazella, J Martinez, W Rostène, and J Costentin. 1994. "In Vivo and in Vitro Structure-Activity Studies with Peptide and Pseudopeptide Neurotensin Analogs Suggest the Existence of Distinct Central Neurotensin Receptor Subtypes.." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 268 (1) (January): 328–336.

LaBuda, Christopher J, and Patrick J Little. 2005. "Pharmacological Evaluation of the Selective Spinal Nerve Ligation Model of Neuropathic Pain in the Rat.." *Journal of Neuroscience Methods* 144 (2) (June 15): 175–181. doi:10.1016/j.jneumeth.2004.11.008.

Lacroix-Fralish, Michael L, Jean-Sebastien Austin, Felix Y Zheng, Daniel J Levitin, and Jeffrey S Mogil. 2011. "Patterns of Pain: Meta-Analysis of Microarray Studies of Pain.." *Pain* 152 (8) (August): 1888–1898. doi:10.1016/j.pain.2011.04.014.

Langford, Dale J, Andrea L Bailey, Mona Lisa Chanda, Sarah E Clarke, Tanya E Drummond, Stephanie Echols, Sarah Glick, et al. 2010. "Coding of Facial Expressions of Pain in the Laboratory Mouse.." *Nature Methods* 7 (6) (June): 447–449. doi:10.1038/nmeth.1455.

Lascelles, Duncan, and Paul Flecknell. 2010. "Do Animal Models Tell Us About Human Pain?." *Pain, Clinical Updates* (July 21): 1–6.

Latrémolière, Alban, and Clifford J Woolf. 2009. "Central Sensitization: a Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity.." *The Journal of Pain : Official Journal of the American Pain Society* 10 (9) (September): 895–926. doi:10.1016/j.jpain.2009.06.012.

LeBlanc, Brian W, Michele L Zerah, Laith M Kadasi, Noori Chai, and Carl Y Saab. 2011. "Minocycline Injection in the Ventral Posterolateral Thalamus Reverses Microglial Reactivity and Thermal Hyperalgesia Secondary to Sciatic Neuropathy.." *Neuroscience Letters* 498 (2) (July 8): 138–142. doi:10.1016/j.neulet.2011.04.077.

Lee, B H, R Won, E J Baik, S H Lee, and C H Moon. 2000. "An Animal Model of Neuropathic Pain Employing Injury to the Sciatic Nerve Branches." *Neuroreport* 11 (4) (March 20): 657–661.

Lee, Kuo-Sheng, Yu-Hsin Huang, and Chen-Tung Yen. 2012. "Periaqueductal Gray Stimulation Suppresses Spontaneous Pain Behavior in Rats.." *Neuroscience Letters* 514 (1) (April 11): 42–45. doi:10.1016/j.neulet.2012.02.053.

Lee, Sang Kyung, Alyssa Siefert, Jagadish Beloor, Tarek M Fahmy, and Priti Kumar. 2012. "Cell-Specific siRNA Delivery by Peptides and Antibodies.." *Methods in Enzymology* 502: 91–122. doi:10.1016/B978-0-12-416039-2.00005-7.

Leong, Mai Lan, Ming Gu, Rebecca Speltz-Paiz, Eleanor I Stahura, Neli Mottey, Clifford J Steer, and Martin Wessendorf. 2011. "Neuronal Loss in the Rostral Ventromedial Medulla in a Rat Model of Neuropathic Pain.." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (47) (November 23): 17028–17039. doi:10.1523/JNEUROSCI.1268-11.2011.

Li, Li, Cory J Xian, Jin-Hua Zhong, and Xin-Fu Zhou. 2002. "Effect of Lumbar 5 Ventral Root Transection on Pain Behaviors: a Novel Rat Model for Neuropathic Pain Without Axotomy of Primary Sensory Neurons.." *Experimental Neurology* 175 (1) (May): 23–34. doi:10.1006/exnr.2002.7897.

Li, Shanshan, Jonathan D Geiger, and Saobo Lei. 2008. "Neurotensin Enhances GABAergic Activity in Rat Hippocampus CA1 Region by Modulating L-Type Calcium Channels." *Journal of Neurophysiology* 99 (5): 2134–2143. doi:10.1152/jn.00890.2007. http://jn.physiology.org/cgi/content/abstract/99/5/2134.

Li, Zhimin, Mona Boules, and Elliott Richelson. 2011. "NT69L Blocks Ethanol-Induced Increase of Dopamine and Glutamate Levels in Striatum of Mouse.." *Neuroscience Letters* 487 (3) (January 10): 322–324. doi:10.1016/j.neulet.2010.10.048.

Liang, Yanqi, Mona Boules, Zhimin Li, Katrina Williams, Tomofumi Miura, Alfredo Oliveros, and Elliott Richelson. 2010. "Hyperactivity of the Dopaminergic System in NTS1 and NTS2 Null Mice.." *Neuropharmacology* 58 (8) (June): 1199–1205. doi:10.1016/j.neuropharm.2010.02.015.

Lipinski, C A, F Lombardo, B W Dominy, and P J Feeney. 2001. "Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings.." *Advanced Drug Delivery Reviews* 46 (1-3) (March 1): 3–26.

Liu, C N, M Michaelis, R Amir, and M Devor. 2000. "Spinal Nerve Injury Enhances Subthreshold Membrane Potential Oscillations in DRG Neurons: Relation to Neuropathic Pain.." *Journal of Neurophysiology* 84 (1) (July): 205–215.

Lombard, M C, B S Nashold, D Albe-Fessard, N Salman, and C Sakr. 1979. "Deafferentation Hypersensitivity in the Rat After Dorsal Rhizotomy: a Possible Animal Model of Chronic Pain.." *Pain* 6 (2) (April): 163–174.

López-Fraga, Marta, Tamara Martínez, and Ana Jiménez. 2009. "RNA Interference Technologies and Therapeutics: From Basic Research to Products.." *BioDrugs : Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy* 23 (5): 305–332. doi:10.2165/11318190-000000000-00000.

Lumley, Mark A, Jay L Cohen, George S Borszcz, Annmarie Cano, Alison M Radcliffe, Laura S Porter, Howard Schubiner, and Francis J Keefe. 2011. "Pain and Emotion: a Biopsychosocial Review of Recent Research.." *Journal of Clinical Psychology* 67 (9) (September): 942–968. doi:10.1002/jclp.20816.

Mahato, Ram I. 2005. "Water Insoluble and Soluble Lipids for Gene Delivery.." *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (5) (April 5): 699–712. doi:10.1016/j.addr.2004.12.005.

Mantyh, P W, S D Rogers, P Honore, B J Allen, J R Ghilardi, J Li, R S Daughters, D A Lappi, R G Wiley, and D A Simone. 1997. "Inhibition of Hyperalgesia by Ablation of Lamina I Spinal Neurons Expressing the Substance P Receptor.." *Science (New York, NY)* 278 (5336) (October 10): 275–279.

Mantyh, Patrick W. 2006. "Cancer Pain and Its Impact on Diagnosis, Survival and Quality of Life.." *Nature Reviews Neuroscience* 7 (10) (October): 797–809. doi:10.1038/nrn1914.

Mao-Ying, Qi-Liang, Jun Zhao, Zhi-Qiang Dong, Jun Wang, Jin Yu, Min-Fen Yan, Yu-Qiu Zhang, Gen-Cheng Wu, and Yan-Qing Wang. 2006. "A Rat Model of Bone Cancer Pain Induced by Intra-Tibia Inoculation of Walker 256 Mammary Gland Carcinoma Cells.." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345 (4) (July 14): 1292–1298. doi:10.1016/j.bbrc.2006.04.186.

Martin, Stéphane, Jean-Pierre Vincent, and Jean Mazella. 2002. "Recycling Ability of the Mouse and the Human Neurotensin Type 2 Receptors Depends on a Single Tyrosine Residue.." *Journal of Cell Science* 115 (Pt 1) (January 1): 165–173.

Martin, Stéphane, Valérie Navarro, Jean-Pierre Vincent, and Jean Mazella. 2002. "Neurotensin Receptor-1 and -3 Complex Modulates the Cellular Signaling of Neurotensin in the HT29 Cell Line.." *Gastroenterology* 123 (4) (October): 1135–1143.

MARTIN, W R. 1967. "Opioid Antagonists." *Pharmacological Reviews*.

Matsumiya, Lynn C, Robert E Sorge, Susana G Sotocinal, John M Tabaka, Jeffrey S Wieskopf, Austin Zaloum, Oliver D King, and Jeffrey S Mogil. 2012. "Using the Mouse Grimace Scale to Reevaluate the Efficacy of Postoperative Analgesics in Laboratory Mice.." *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* 51 (1) (January): 42–49.

Mauderli, A P, A Acosta-Rua, and C J Vierck. 2000. "An Operant Assay of Thermal Pain in Conscious, Unrestrained Rats.." *Journal of Neuroscience Methods* 97 (1) (April 1): 19–29.

Mazella, J, J M Botto, E Guillemare, T Coppola, P Sarret, and J P Vincent. 1996. "Structure, Functional Expression, and Cerebral Localization of the Levocabastine-Sensitive Neurotensin/Neuromedin N Receptor From Mouse Brain.." *Journal of Neuroscience* 16 (18) (September 15): 5613–5620.

Mazella, J, N Zsürger, V Navarro, J Chabry, M Kaghad, D Caput, P Ferrara, et al. 1998. "The 100-kDa Neurotensin Receptor Is Gp95/Sortilin, a Non-G-Protein-Coupled Receptor.." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (41) (October 9): 26273–26276.

Mazella, Jean, and Jean-Pierre Vincent. 2006. "Internalization and Recycling Properties of Neurotensin Receptors.." *Peptides* 27 (10) (October): 2488–2492. doi:10.1016/j.peptides.2006.02.012.

McGreevy, Kai, Michael M Bottros, and Srinivasa N Raja. 2011. "Preventing Chronic Pain Following Acute Pain: Risk Factors, Preventive Strategies, and Their Efficacy.." *European Journal of Pain Supplements* 5 (2) (November 11): 365–372. doi:10.1016/j.eujps.2011.08.013.

McMahon, Stephen B, William B J Cafferty, and Fabien Marchand. 2005. "Immune and Glial Cell Factors as Pain Mediators and Modulators.." *Experimental Neurology* 192 (2) (April): 444–462. doi:10.1016/j.expneurol.2004.11.001.

McMahon, Stephen, Martin Koltzenburg, Irene Tracey, and Dennis C Turk. 2013. *Wall & Melzack's Textbook of Pain*. Elsevier Health Sciences.

Melzack, R, and P D Wall. 1965. "Pain Mechanisms: a New Theory." *Science (New York, NY)* 150 (699) (November 19): 971–979.

Merkel, Olivia M, Andrea Beyerle, Damiano Librizzi, Andreas Pfestroff, Thomas M Behr, Brian Sproat, Peter J Barth, and Thomas Kissel. 2009. "Nonviral siRNA Delivery to the Lung: Investigation of PEG-PEI Polyplexes and Their in Vivo Performance." *Molecular Pharmaceutics* 6 (4): 1246–1260. doi:10.1021/mp900107v.

Metz, Alexia E, Hau-Jie Yau, Maria Virginia Centeno, A Vania Apkarian, and Marco Martina. 2009. "Morphological and Functional Reorganization of Rat Medial Prefrontal Cortex in Neuropathic Pain.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (7) (February 17): 2423–2428. doi:10.1073/pnas.0809897106.

Miletic, G, K M Sullivan, A M K Dodson, J A Lippitt, J A Schneider, and V Miletic. 2011. "Changes in Calcineurin Message, Enzyme Activity and Protein Content in the Spinal Dorsal Horn Are Associated with Chronic Constriction Injury of the Rat Sciatic Nerve.." *Neuroscience* 188 (August 11): 142–147. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.05.013.

Millan, Mark J. 2002. "Descending Control of Pain." *Progress in Neurobiology* 66 (6) (April 1): 355–474.

Milligan, E D, E M Sloane, and L R Watkins. 2008. "Glia in Pathological Pain: a Role for Fractalkine.." *Journal of Neuroimmunology* 198 (1-2) (July 31): 113–120. doi:10.1016/j.jneuroim.2008.04.011.

Mobily, P R, K A Herr, and L S Kelley. 1993. "Cognitive-Behavioral Techniques to Reduce Pain: a Validation Study.." *International Journal of Nursing Studies* 30 (6) (December): 537–548.

Mogil, Jeffrey S. 2009. "Animal Models of Pain: Progress and Challenges." *Nature Reviews Neuroscience* 10 (4) (April 1): 283–294. doi:10.1038/nrn2606.

Mogil, Jeffrey S, Allyson C Graham, Jennifer Ritchie, Sara F Hughes, Jean-Sebastien Austin, Ara Schorscher-Petcu, Dale J Langford, and Gary J Bennett. 2010. "Hypolocomotion, Asymmetrically Directed Behaviors (Licking, Lifting, Flinching, and Shaking) and Dynamic Weight Bearing (Gait) Changes Are Not Measures of Neuropathic Pain in Mice.." *Molecular Pain* 6: 34. doi:10.1186/1744-8069-6-34.

Mogil, Jeffrey S, and Sara E Crager. 2004. "What Should We Be Measuring in Behavioral Studies of Chronic Pain in Animals?." *Pain* 112 (1-2) (November): 12–15. doi:10.1016/j.pain.2004.09.028.

Moisset, Xavier, and Didier Bouhassira. 2007. "Brain Imaging of Neuropathic Pain.." *NeuroImage* 37 Suppl 1: S80–8. doi:10.1016/j.neuroimage.2007.03.054.

Molander, C, and G Grant. 1986. "Laminar Distribution and Somatotopic Organization of Primary Afferent Fibers From Hindlimb Nerves in the Dorsal Horn. a Study by Transganglionic Transport of Horseradish Peroxidase in the Rat." *Neuroscience*.

Morinville, Anne, Stéphane Martin, Mariette Lavallée, Jean-Pierre Vincent, Alain Beaudet, and Jean Mazella. 2004. "Internalization and Trafficking of Neurotensin via NTS3 Receptors in HT29 Cells.." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*

36 (11) (November): 2153–2168. doi:10.1016/j.biocel.2004.04.013.
Mosconi, T, and L Kruger. 1996. "Fixed-Diameter Polyethylene Cuffs Applied to the Rat Sciatic Nerve Induce a Painful Neuropathy: Ultrastructural Morphometric Analysis of Axonal Alterations." *Pain* 64 (1): 37–57.
Motoi, Y, T Aizawa, S Haga, S Nakamura, Y Namba, and K Ikeda. 1999. "Neuronal Localization of a Novel Mosaic Apolipoprotein E Receptor, LR11, in Rat and Human Brain.." *Brain Research* 833 (2) (July 3): 209–215.
Moulin, D E DE, A J AJ Clark, I I Gilron, M A MA Ware, C P N CP Watson, B J BJ Sessle, T T Coderre, et al. 2007. "Pharmacological Management of Chronic Neuropathic Pain - Consensus Statement and Guidelines From the Canadian Pain Society.." In, 12:13–21.
Moulton, Eric A, Igor Elman, Gautam Pendse, Jeremy Schmahmann, Lino Becerra, and David Borsook. 2011. "Aversion-Related Circuitry in the Cerebellum: Responses to Noxious Heat and Unpleasant Images.." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (10) (March 9): 3795–3804. doi:10.1523/JNEUROSCI.6709-10.2011.
Mustain, W Conan, Piotr G Rychahou, and B Mark Evers. 2011. "The Role of Neurotensin in Physiologic and Pathologic Processes." *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity* 18 (1) (February 1): 75–82. doi:10.1097/MED.0b013e3283419052.
Nagakura, Yukinori, Go Ishikawa, Sachiko Kawasaki-Yatsugi, Eiji Yoshimi, Nobuaki Takeshita, Toshiaki Aoki, Yasuaki Shimizu, and Hiroyuki Ito. 2012. "New Methodologies in Drug Discovery Research for Analgesic Agents: Automated Measurement of Spontaneous Pain-Associated Animal Behaviors for Alignment of Preclinical/Clinical Endpoints.." *Nihon Yakurigaku Zasshi. Folia Pharmacologica Japonica* 140 (5) (November): 211–215.
Navarro, V, S Martin, P Sarret, M S Nielsen, C M Petersen, J Vincent, and J Mazella. 2001. "Pharmacological Properties of the Mouse Neurotensin Receptor 3. Maintenance of Cell Surface Receptor During Internalization of Neurotensin.." *FEBS Letters* 495 (1-2) (April 20): 100–105.
Navratilova, Edita, Jennifer Yanhua Xie, Tamara King, and Frank Porreca. 2013. "Evaluation of Reward From Pain Relief.." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1282 (1) (April): 1–11. doi:10.1111/nyas.12095.
Nemeroff, C B, G Bissette, A J Prange, P T Loosen, T S Barlow, and M A Lipton. 1977. "Neurotensin: Central Nervous System Effects of a Hypothalamic Peptide.." *Brain Research* 128 (3) (June 17): 485–496.
Neu, Michael, Dagmar Fischer, and Thomas Kissel. 2005. "Recent Advances in Rational Gene Transfer Vector Design Based on Poly(Ethylene Imine) and Its Derivatives.." *The Journal of Gene Medicine* 7 (8) (August): 992–1009. doi:10.1002/jgm.773.
Nicholson, Bruce, and Sunil Verma. 2004. "Comorbidities in Chronic Neuropathic Pain." *Pain Medicine (Malden, Mass)* 5 Suppl 1 (March 1): S9–S27.
Nielsen, M S, C Jacobsen, G Olivecrona, J Gliemann, and C M Petersen. 1999. "Sortilin/Neurotensin Receptor-3 Binds and Mediates Degradation of Lipoprotein Lipase.." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (13) (March 26): 8832–8836.
Niemegeers, C J, J A Van Bruggen, and P A Janssen. 1975. "Suprofen, a Potent Antagonist of Acetic Acid-Induced Writhing in Rats.." *Arzneimittel-Forschung* 25 (10) (October): 1505–1509.

Nozaki, Chihiro, Angela Maria Vergnano, Dominique Filliol, Abdel-Mouttalib Ouagazzal, Anne Le Goff, Stéphanie Carvalho, David Reiss, et al. 2011. "Zinc Alleviates Pain Through High-Affinity Binding to the NMDA Receptor NR2A Subunit.." *Nature Neuroscience* 14 (8) (August): 1017–1022. doi:10.1038/nn.2844.

O'Connor, Alec B, and Robert H Dworkin. 2009. "Treatment of Neuropathic Pain: an Overview of Recent Guidelines.." *The American Journal of Medicine* 122 (10 Suppl) (October): S22–32. doi:10.1016/j.amjmed.2009.04.007.

Obrosova, Irina G. 2009. "Diabetic Painful and Insensate Neuropathy: Pathogenesis and Potential Treatments." *Nurt* 6 (4) (October 1): 638–647. doi:10.1016/j.nurt.2009.07.004. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=19789069.

Ohnami, Soichiro, Mitsuo Tanabe, Shunji Shinohara, Keiko Takasu, Akira Kato, and Hideki Ono. 2011. "Role of Voltage-Dependent Calcium Channel Subtypes in Spinal Long-Term Potentiation of C-Fiber-Evoked Field Potentials.." *Pain* 152 (3) (March): 623–631. doi:10.1016/j.pain.2010.12.004.

Olejniczak, Marta, Paulina Galka, and Wlodzimierz J Krzyzosiak. 2010. "Sequence-Non-Specific Effects of RNA Interference Triggers and microRNA Regulators.." *Nucleic Acids Research* 38 (1) (January): 1–16. doi:10.1093/nar/gkp829.

Olesen, Anne Estrup, Trine Andresen, Camilla Staahl, and Asbjørn Mohr Drewes. 2012. "Human Experimental Pain Models for Assessing the Therapeutic Efficacy of Analgesic Drugs.." *Pharmacological Reviews* 64 (3) (July): 722–779. doi:10.1124/pr.111.005447.

Orhan, Cahide Elif, Aytül Onal, and Sibel Ulker. 2010. "Antihyperalgesic and Antiallodynic Effect of Sirolimus in Neuropathic Pain and the Role of Cytokines in This Effect.." *Neuroscience Letters* 481 (1) (August 30): 17–20. doi:10.1016/j.neulet.2010.06.039.

Osbahr, A J AJ, C B CB Nemeroff, D D Luttinger, G A GA Mason, and A J AJ Prange. 1981. "Neurotensin-Induced Antinociception in Mice: Antagonism by Thyrotropin-Releasing Hormone.." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 217 (3) (June 1): 645–651.

Pagé, M Gabrielle, Jennifer Stinson, Fiona Campbell, Lisa Isaac, and Joel Katz. 2013. "Identification of Pain-Related Psychological Risk Factors for the Development and Maintenance of Pediatric Chronic Postsurgical Pain.." *Journal of Pain Research* 6: 167–180. doi:10.2147/JPR.S40846.

Pajouhesh, Hassan, and George R Lenz. 2005. "Medicinal Chemical Properties of Successful Central Nervous System Drugs.." *NeuroRx : the Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2 (4) (October): 541–553. doi:10.1602/neurorx.2.4.541.

Patrycja, Patrycja Kleczkowska, and Andrzej W Lipkowski. 2013. "Neurotensin and Neurotensin Receptors: Characteristic, Structure-Activity Relationship and Pain Modulation -a Review.." *European Journal of Pharmacology* (March 13). doi:10.1016/j.ejphar.2013.03.004.

Pedersen, Louise Henriette, Jørgen Scheel-Krüger, and Gordon Blackburn-Munro. 2007. "Amygdala GABA-a Receptor Involvement in Mediating Sensory-Discriminative and Affective-Motivational Pain Responses in a Rat Model of Peripheral Nerve Injury.." *Pain* 127 (1-2) (January): 17–26. doi:10.1016/j.pain.2006.06.036.

Pelaprat, Didier. 2006. “Interactions Between Neurotensin Receptors and G Proteins.” *Peptides* 27 (10) (October 1): 2476–2487. doi:10.1016/j.peptides.2006.04.027.

Perron, Amélie, Philippe Sarret, Louis Gendron, Thomas Stroh, and Alain Beaudet. 2005. “Identification and Functional Characterization of a 5-Transmembrane Domain Variant Isoform of the NTS2 Neurotensin Receptor in Rat Central Nervous System..” *The Journal of Biological Chemistry* 280 (11) (March 18): 10219–10227. doi:10.1074/jbc.M410557200.

Petkova-Kirova, P, A Rakovska, and L Della Corte. 2008. “Neurotensin Modulation of Acetylcholine, GABA, and Aspartate Release From Rat Prefrontal Cortex Studied in Vivo with Microdialysis.” *Brain Research*.

Pettibone, Douglas J, J Fred Hess, Patricia J Hey, Marlene A Jacobson, Michael Leviten, Edward V Lis, Pierre J Mallorga, et al. 2002. “The Effects of Deleting the Mouse Neurotensin Receptor NTR1 on Central and Peripheral Responses to Neurotensin..” *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 300 (1) (January): 305–313.

Poinot-Chazel, C, M Portier, M Bouaboula, N Vita, F Pecceu, D Gully, J G Monroe, J P Maffrand, G Le Fur, and P Casellas. 1996. “Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Couples Neurotensin Receptor Stimulation to Induction of the Primary Response Gene Krox-24..” *The Biochemical Journal* 320 ( Pt 1) (November 15): 145–151.

Portenoy, Russell K, Daniel Bruns, Bonnie Shoemaker, and Steven A Shoemaker. 2010. “Breakthrough Pain in Community-Dwelling Patients with Cancer Pain and Noncancer Pain, Part 2: Impact on Function, Mood, and Quality of Life..” *Journal of Opioid Management* 6 (2) (March): 109–116.

Pradhan, Amynah Amir Ali, Xiao Hong Yu, and Jennifer M A Laird. 2010. “Modality of Hyperalgesia Tested, Not Type of Nerve Damage, Predicts Pharmacological Sensitivity in Rat Models of Neuropathic Pain..” *European Journal of Pain (London, England)* 14 (5) (May): 503–509. doi:10.1016/j.ejpain.2009.08.010.

Rajagopal, Sudarshan, Keshava Rajagopal, and Robert J Lefkowitz. 2010. “Teaching Old Receptors New Tricks: Biasing Seven-Transmembrane Receptors..” *Nature Reviews Drug Discovery* 9 (5) (May): 373–386. doi:10.1038/nrd3024.

Rashid, M H, Y Theberge, S J Elmes, M N Perkins, and F McIntosh. 2012. “Pharmacological Validation of Early and Late Phase of Rat Mono-Iodoacetate Model Using the Tekscan System..” *European Journal of Pain* 17 (2) (September 11): 210–222. doi:10.1002/j.1532-2149.2012.00176.x. http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=22968802&retmode=ref&cmd=prlinks.

Rasminsky, M. 1980. “Ephaptic Transmission Between Single Nerve Fibres in the Spinal Nerve Roots of Dystrophic Mice..” *The Journal of Physiology* 305 (August): 151–169.

Ren, Ke, and Ronald Dubner. 2008. “Neuron-Glia Crosstalk Gets Serious: Role in Pain Hypersensitivity..” *Current Opinion in Anaesthesiology* 21 (5) (October): 570–579. doi:10.1097/ACO.0b013e32830edbdf.

Richner, M, L T Pallesen, Dominic Boudreau, Ole J Bjerrum, Yves De Koninck, A Nykjaer, and C B Vaegter. 2013. “Sortilin in Neuropathic Pain.” Poster from the neuropathic special interest group 4th international meeting.

Rivier, J E, L H Lazarus, M H Perrin, and M R Brown. 1977. “Neurotensin Analogues. Structure--Activity Relationships..” *Journal of Medicinal Chemistry* 20 (11)

(November): 1409–1412.
Rose, Scott D, Dong-Ho Kim, Mohammed Amarzguioui, Jeremy D Heidel, Michael A Collingwood, Mark E Davis, John J Rossi, and Mark A Behlke. 2005. "Functional Polarity Is Introduced by Dicer Processing of Short Substrate RNAs.." *Nucleic Acids Research* 33 (13): 4140–4156. doi:10.1093/nar/gki732.
Rossi, Grace C, Joshua E Matulonis, Elliott Richelson, Denise Barbut, and Gavril W Pasternak. 2010. "Systemically and Topically Active Antinociceptive Neurotensin Compounds." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 334 (3) (September 1): 1075–1079. doi:10.1124/jpet.109.165282.
Rost, Kristin, Franziska Fleischer, and Karen Nieber. 2006. "[Neurokinin 1 Receptor Antagonists--Between Hope and Disappointment].." *Medizinische Monatsschrift Für Pharmazeuten* 29 (6) (June): 200–205.
Roussy, G, H Beaudry, M Lafrance, K Belleville, N Beaudet, K Wada, L Gendron, and P Sarret. 2010. "Altered Morphine-Induced Analgesia in Neurotensin Type 1 Receptor Null Mice.." *Neuroscience* 170 (4) (November 10): 1286–1294. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.08.016.
Roussy, Geneviève, Marc-André Dansereau, Louis Doré-Savard, Karine Belleville, Nicolas Beaudet, Elliott Richelson, and Philippe Sarret. 2008. "Spinal NTS1 Receptors Regulate Nociceptive Signaling in a Rat Formalin Tonic Pain Model.." *Journal of Neurochemistry* 105 (4) (May): 1100–1114. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05205.x.
Roussy, Geneviève, Marc-André Dansereau, Stéphanie Baudisson, Faouzi Ezzoubaa, Karine Belleville, Nicolas Beaudet, Jean Martinez, Elliott Richelson, and Philippe Sarret. 2009. "Evidence for a Role of NTS2 Receptors in the Modulation of Tonic Pain Sensitivity.." *Molecular Pain* 5: 38. doi:10.1186/1744-8069-5-38.
Röhl, Thomas, and Jens Kurreck. 2006. "RNA Interference in Pain Research." *Journal of Neurochemistry* 99 (2) (October 1): 371–380. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04082.x.
Ruscheweyh, Ruth, Oliver Wilder-Smith, Ruth Drdla, Xian-Guo Liu, and Jürgen Sandkühler. 2011. "Long-Term Potentiation in Spinal Nociceptive Pathways as a Novel Target for Pain Therapy.." *Molecular Pain* 7: 20. doi:10.1186/1744-8069-7-20.
Saab, Carl Y, Stephen G Waxman, and Bryan C Hains. 2008. "Alarm or Curse? the Pain of Neuroinflammation.." *Brain Research Reviews* 58 (1) (June): 226–235. doi:10.1016/j.brainresrev.2008.04.002.
Sah, Dinah W Y. 2006. "Therapeutic Potential of RNA Interference for Neurological Disorders." *Life Sciences* 79 (19) (October 4): 1773–1780. doi:10.1016/j.lfs.2006.06.011.
Sandkühler, Jürgen. 2009. "Models and Mechanisms of Hyperalgesia and Allodynia." *Physiological Reviews* 89 (2) (April 1): 707–758. doi:10.1152/physrev.00025.2008.
Sarret, P, A Beaudet, J P Vincent, and J Mazella. 1998. "Regional and Cellular Distribution of Low Affinity Neurotensin Receptor mRNA in Adult and Developing Mouse Brain.." *The Journal of Comparative Neurology* 394 (3) (May 11): 344–356.
Sarret, Philippe, Amélie Perron, Thomas Stroh, and Alain Beaudet. 2003. "Immunohistochemical Distribution of NTS2 Neurotensin Receptors in the Rat Central Nervous System.." *The Journal of Comparative Neurology* 461 (4) (July 7): 520–538. doi:10.1002/cne.10718.
Sarret, Philippe, and Alain Beaudet. 2003. *Neurotensin Receptors in the Central Nervous System*. *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Vol. 20. Elsevier. doi:10.1016/S0924-8196(02)80008-2.

Sarret, Philippe, Louis Doré-Savard, and Nicolas Beaudet. 2010. "Direct Application of siRNA for in Vivo Pain Research.." *Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ)* 623: 383–395. doi:10.1007/978-1-60761-588-0_25.

Sarret, Philippe, Louis Doré-Savard, Pascal Tétreault, Valérie Bégin-Lavallée, and Nicolas Beaudet. 2010. *RNA Technologies and Their Applications. Chapter 7 : Application of Dicer-Substrate siRNA in Pain Research*
. Edited by Volker A Erdmann and Jan Barciszewski. *RNA Technologies and …*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-12168-5_7.

Sarret, Philippe, Louis Doré-Savard, Pascal Tétreault, Valérie Bégin-Lavallée, Marc-André Dansereau, and Nicolas Beaudet. 2011. *METHODS for the DISCOVERY and CHARACTERIZATION of G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS. Chapter 19: Using RNA Interference to Downregulate G Protein-Coupled Receptors*. Edited by Craig W Stevens. *Springer*
. Vol. 60. Totowa, NJ: Humana Press. doi:10.1007/978-1-61779-179-6_19.

Sarret, Philippe, Louis Gendron, Peter Kilian, Ha Minh Ky Nguyen, Nicole Gallo-Payet, Marcel-Daniel Payet, and Alain Beaudet. 2002. "Pharmacology and Functional Properties of NTS2 Neurotensin Receptors in Cerebellar Granule Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (39) (September 27): 36233–36243. doi:10.1074/jbc.M202586200.

Sarret, Philippe, Michael J Esdaile, Amélie Perron, Jean Martinez, Thomas Stroh, and Alain Beaudet. 2005. "Potent Spinal Analgesia Elicited Through Stimulation of NTS2 Neurotensin Receptors.." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (36) (September 7): 8188–8196. doi:10.1523/JNEUROSCI.0810-05.2005.

Sarret, Philippe, Pascale Krzywkowski, Laura Segal, Morten S Nielsen, Claus M Petersen, Jean Mazella, Thomas Stroh, and Alain Beaudet. 2003. "Distribution of NTS3 Receptor/Sortilin mRNA and Protein in the Rat Central Nervous System.." *The Journal of Comparative Neurology* 461 (4) (July 7): 483–505. doi:10.1002/cne.10708.

Sarrieau, A, F Javoy-Agid, P Kitabgi, M Dussaillant, M Vial, J P Vincent, Y Agid, and W H Rostène. 1985. "Characterization and Autoradiographic Distribution of Neurotensin Binding Sites in the Human Brain.." *Brain Research* 348 (2) (December 2): 375–380.

Scaggiante, Bruna, Barbara Dapas, Rossella Farra, Mario Grassi, Gabriele Pozzato, Carlo Giansante, Nicola Fiotti, and Gabriele Grassi. 2011. "Improving siRNA Bio-Distribution and Minimizing Side Effects.." *Current Drug Metabolism* 12 (1) (January): 11–23.

Scholz, Joachim, Andrea Abele, Claudiu Marian, Annett Häussler, Teri A Herbert, Clifford J Woolf, and Irmgard Tegeder. 2008. "Low-Dose Methotrexate Reduces Peripheral Nerve Injury-Evoked Spinal Microglial Activation and Neuropathic Pain Behavior in Rats.." *Pain* 138 (1) (August 15): 130–142. doi:10.1016/j.pain.2007.11.019.

Schotte, A, J E Leysen, and P M Laduron. 1986. "Evidence for a Displaceable Non-Specific [3H]Neurotensin Binding Site in Rat Brain.." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 333 (4) (August): 400–405.

Schwartz, Erica S, Jun-Ho La, Nicole N Scheff, Brian M Davis, Kathryn M Albers, and G F Gebhart. 2013. "TRPV1 and TRPA1 Antagonists Prevent the Transition of Acute to Chronic Inflammation and Pain in Chronic Pancreatitis.." *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 33 (13) (March 27): 5603–5611. doi:10.1523/JNEUROSCI.1806-12.2013.

Schweinhardt, Petra, Chris Glynn, Jonathan Brooks, Henry McQuay, Tim Jack, Iain Chessell, Chas Bountra, and Irene Tracey. 2006. "An fMRI Study of Cerebral Processing of Brush-Evoked Allodynia in Neuropathic Pain Patients." *NeuroImage* 32 (1) (August 1): 256–265. doi:10.1016/j.neuroimage.2006.03.024.

Seltzer, Z, R Dubner, and Y Shir. 1990. "A Novel Behavioral Model of Neuropathic Pain Disorders Produced in Rats by Partial Sciatic Nerve Injury." *Pain* 43 (2) (November 1): 205–218.

Seutin, V, L Massotte, and A Dresse. 1989. "Electrophysiological Effects of Neurotensin on Dopaminergic Neurones of the Ventral Tegmental Area of the Rat in Vitro.." *Neuropharmacology* 28 (9) (September): 949–954.

Seutin, Vincent. 2005. "Dopaminergic Neurones: Much More Than Dopamine?." *British Journal of Pharmacology* 146 (2) (September): 167–169. doi:10.1038/sj.bjp.0706328.

Shinoda, Masamichi, Kiyohito Kawashima, Noriyuki Ozaki, Hideaki Asai, Kenjiro Nagamine, and Yasuo Sugiura. 2007. "P2X3 Receptor Mediates Heat Hyperalgesia in a Rat Model of Trigeminal Neuropathic Pain.." *The Journal of Pain : Official Journal of the American Pain Society* 8 (7) (July): 588–597. doi:10.1016/j.jpain.2007.03.001.

Shityakov, Sergey, Winfried Neuhaus, Thomas Dandekar, and Carola Förster. 2013. "Analysing Molecular Polar Surface Descriptors to Predict Blood-Brain Barrier Permeation.." *International Journal of Computational Biology and Drug Design* 6 (1-2): 146–156. doi:10.1504/IJCBDD.2013.052195.

Siddall, Philip J, and Michael J Cousins. 2004. "Persistent Pain as a Disease Entity: Implications for Clinical Management.." *Anesthesia and Analgesia* 99 (2) (August): 510–20– table of contents. doi:10.1213/01.ANE.0000133383.17666.3A.

Singh, Sunit Kumar, and Praveensingh B Hajeri. 2009. "siRNAs: Their Potential as Therapeutic Agents--Part II. Methods of Delivery." *Drug Discovery Today* 14 (17-18) (September 1): 859–865. doi:10.1016/j.drudis.2009.06.002.

Sioud, Mouldy. 2007. "RNA Interference and Innate Immunity.." *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (2-3) (March 30): 153–163. doi:10.1016/j.addr.2007.03.006.

Skrzydelski, Delphine, Anne-Marie Lhiaubet, Antony Lebeau, Patricia Forgez, Misa Yamada, Emmanuel Hermans, William Rostène, and Didier Pelaprat. 2003. "Differential Involvement of Intracellular Domains of the Rat NTS1 Neurotensin Receptor in Coupling to G Proteins: a Molecular Basis for Agonist-Directed Trafficking of Receptor Stimulus.." *Molecular Pharmacology* 64 (2) (August): 421–429. doi:10.1124/mol.64.2.421.

Sluka, Kathleen A, and Deirdre Walsh. 2003. "Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation: Basic Science Mechanisms and Clinical Effectiveness.." *The Journal of Pain : Official Journal of the American Pain Society* 4 (3) (April): 109–121.

Sluka, Kathleen A, Jan M Bjordal, Serge Marchand, and Barbara A Rakel. 2013. "What Makes Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation Work? Making Sense of the Mixed Results in the Clinical Literature.." *Physical Therapy* (May 2). doi:10.2522/ptj.20120281.

Smith, D J, A A Hawranko, P J Monroe, D Gully, M O Urban, C R Craig, J P Smith, and D L Smith. 1997. "Dose-Dependent Pain-Facilitatory and -Inhibitory Actions of Neurotensin Are Revealed by SR 48692, a Nonpeptide Neurotensin Antagonist: Influence on the Antinociceptive Effect of Morphine.." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 282 (2) (August): 899–908.

Smith, Kristin E, Mona Boules, Katrina Williams, Abdul H Fauq, and Elliott Richelson.

2011. “The Role of NTS2 in the Development of Tolerance to NT69L in Mouse Models for Hypothermia and Thermal Analgesia..” *Behavioural Brain Research* 224 (2) (October 31): 344–349. doi:10.1016/j.bbr.2011.06.014.

Smith, Kristin E, Mona Boules, Katrina Williams, and Elliott Richelson. 2012. “NTS1 and NTS2 Mediate Analgesia Following Neurotensin Analog Treatment in a Mouse Model for Visceral Pain..” *Behavioural Brain Research* (April 5). doi:10.1016/j.bbr.2012.03.044.

Sotocinal, Susana G, Robert E Sorge, Austin Zaloum, Alexander H Tuttle, Loren J Martin, Jeffrey S Wieskopf, Josiane C S Mapplebeck, et al. 2011. “The Rat Grimace Scale: a Partially Automated Method for Quantifying Pain in the Laboratory Rat via Facial Expressions..” *Molecular Pain* 7: 55. doi:10.1186/1744-8069-7-55.

St-Gelais, Fannie, Mark Legault, Marie-Josée Bourque, Pierre-Paul Rompré, and Louis-Eric Trudeau. 2004. “Role of Calcium in Neurotensin-Evoked Enhancement in Firing in Mesencephalic Dopamine Neurons..” *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (10) (March 10): 2566–2574. doi:10.1523/JNEUROSCI.5376-03.2004.

Stiller, C O, H Gustafsson, K Fried, and E Brodin. 1997. “Opioid-Induced Release of Neurotensin in the Periaqueductal Gray Matter of Freely Moving Rats..” *Brain Research* 774 (1-2) (November 7): 149–158.

Stubhaug, Audun. 2005. “Can Opioids Prevent Post-Operative Chronic Pain?.” *European Journal of Pain (London, England)* 9 (2) (April): 153–156. doi:10.1016/j.ejpain.2004.07.008.

Sufka, K J. 1994. “Conditioned Place Preference Paradigm: a Novel Approach for Analgesic Drug Assessment Against Chronic Pain..” *Pain* 58 (3) (September): 355–366.

Sullivan, Mark D, and Jane C Ballantyne. 2012. “What Are We Treating with Long-Term Opioid Therapy?.” *Archives of Internal Medicine* 172 (5) (March 12): 433–434. doi:10.1001/archinternmed.2011.2156.

Suter, Marc R, Yeong-Ray Wen, Isabelle Decosterd, and Ru-Rong Ji. 2007. “Do Glial Cells Control Pain?.” *Neuron Glia Biology* 3 (3) (August): 255–268. doi:10.1017/S1740925X08000100.

Tabo, E, S L Jinks, J H Eisele, and E Carstens. 1999. “Behavioral Manifestations of Neuropathic Pain and Mechanical Allodynia, and Changes in Spinal Dorsal Horn Neurons, Following L4-L6 Dorsal Root Constriction in Rats..” *Pain* 80 (3) (April): 503–520.

Tan, Ping-Heng, Lin-Cheng Yang, and Ru-Rong Ji. 2009. “Therapeutic Potential of RNA Interference in Pain Medicine..” *The Open Pain Journal* 2 (January 1): 57–63. doi:10.2174/1876386300902010057.

Tanaka, K, M Masu, and S Nakanishi. 1990. “Structure and Functional Expression of the Cloned Rat Neurotensin Receptor.” *Neuron* 4 (6) (June 1): 847–854.

Tesfaye, S, A J M Boulton, P J Dyck, R Freeman, M Horowitz, P Kempler, G Lauria, et al. 2010. “Diabetic Neuropathies: Update on Definitions, Diagnostic Criteria, Estimation of Severity, and Treatments.” *Diabetes Care* 33 (10) (September 28): 2285–2293. doi:10.2337/dc10-1303.

Teyler, T J. 1987. “Long-Term Potentiation and Memory..” *International Journal of Neurology* 21-22: 163–171.

Tétreault, Pascal, Marc-André Dansereau, Louis Doré-Savard, Nicolas Beaudet, and

Philippe Sarret. 2011. “Weight Bearing Evaluation in Inflammatory, Neuropathic and Cancer Chronic Pain in Freely Moving Rats..” *Physiology & Behavior* 104 (3) (September 1): 495–502. doi:10.1016/j.physbeh.2011.05.015.

Tétreault, Pascal, N Beaudet, A Perron, K Belleville, A Rene, F Cavelier, J Martinez, et al. 2013. “Spinal NTS2 Receptor Activation Reverses Signs of Neuropathic Pain.” *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* (June 11). doi:10.1096/fj.12-225540.

Tétreault, Pascal, Nicolas Beaudet, and Philippe Sarret. 2011. “*RNA Interference: a New Approach to Treat Pain*.” *Douleur Et Analgésie* 24 (S2) (September 30): 30–42. doi:10.1007/s11724-011-0245-9.

Tian, David H, Chamini J Perera, and Gila Moalem-Taylor. 2013. “Neuropathic Pain in Animal Models of Nervous System Autoimmune Diseases..” *Mediators of Inflammation* 2013: 298326. doi:10.1155/2013/298326.

Torrance, Nicola, Blair H Smith, Michael I Bennett, and Amanda J Lee. 2006. “The Epidemiology of Chronic Pain of Predominantly Neuropathic Origin. Results From a General Population Survey..” *The Journal of Pain : Official Journal of the American Pain Society* 7 (4) (April): 281–289. doi:10.1016/j.jpain.2005.11.008.

Tracey, Irene. 2011. “Can Neuroimaging Studies Identify Pain Endophenotypes in Humans?.” *Nature Reviews. Neurology* 7 (3) (March): 173–181. doi:10.1038/nrneurol.2011.4.

Treede, R-D, R A Meyer, S N Raja, and J N Campbell. 1995. “Evidence for Two Different Heat Transduction Mechanisms in Nociceptive Primary Afferents Innervating Monkey Skin..” *The Journal of Physiology* 483 ( Pt 3) (March 15): 747–758.

Ueda, Hiroshi, and M Harunor Rashid. 2003. “Molecular Mechanism of Neuropathic Pain.” *Drug News & Perspectives* 16 (9) (November 1): 605–613.

Uhl, G R, J P Bennett, and S H Snyder. 1977. “Neurotensin, a Central Nervous System Peptide: Apparent Receptor Binding in Brain Membranes..” *Brain Research* 130 (2) (July 15): 299–313.

Vachon, Pascal, Robert Massé, and Bernard F Gibbs. 2004. “Substance P and Neurotensin Are Up-Regulated in the Lumbar Spinal Cord of Animals with Neuropathic Pain.” *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne De Recherche Vétérinaire* 68 (2) (April 1): 86–92.

Vera-Portocarrero, L P, E-T Zhang, M H Ossipov, J Y Xie, T King, J Lai, and F Porreca. 2006. “Descending Facilitation From the Rostral Ventromedial Medulla Maintains Nerve Injury-Induced Central Sensitization..” *Neuroscience* 140 (4) (July 21): 1311–1320. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.03.016.

Vierck, C J, P T Hansson, and R P Yezierski. 2008. “Clinical and Pre-Clinical Pain Assessment: Are We Measuring the Same Thing?.” *Pain* 135 (1-2) (March): 7–10. doi:10.1016/j.pain.2007.12.008.

Villanueva, L. 2000. “Is There a Gap Between Preclinical and Clinical Studies of Analgesia?.” *Trends in Pharmacological Sciences* 21 (12) (December): 461–2– author reply 465.

Vincent, J P, J Mazella, and P Kitabgi. 1999. “Neurotensin and Neurotensin Receptors..” *Trends in Pharmacological Sciences* 20 (7) (July): 302–309.

Vivet, Bertrand, Florine Cavelier, and Jean Martinez. 2000. “Synthesis of Silaproline, a New Proline Surrogate.” *European Journal of Organic Chemistry* 2000 (5): 807–811.

Vrinten, Dorien H, and Frank F T Hamers. 2003. “‘CatWalk’ Automated Quantitative Gait

Analysis as a Novel Method to Assess Mechanical Allodynia in the Rat; a Comparison with Von Frey Testing..” *Pain* 102 (1-2) (March): 203–209.

Walczak, J-S, V Pichette, F Leblond, K Desbiens, and P Beaulieu. 2005. “Behavioral, Pharmacological and Molecular Characterization of the Saphenous Nerve Partial Ligation: a New Model of Neuropathic Pain..” *Neuroscience* 132 (4): 1093–1102. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.02.010.

Wall, P D, M Devor, R Inbal, J W Scadding, D Schonfeld, Z Seltzer, and M M Tomkiewicz. 1979. “Autotomy Following Peripheral Nerve Lesions: Experimental Anaesthesia Dolorosa.” *Pain* 7 (2) (October 1): 103–111.

Wallace, Victoria C J, Timothy A Norbury, and Andrew S C Rice. 2012. “Ultrasound Vocalisation by Rodents Does Not Correlate with Behavioural Measures of Persistent Pain.” *European Journal of Pain* 9 (4) (January 11): 445–445. doi:10.1016/j.ejpain.2004.10.006.

Waterhouse, Rikki N. 2003. “Determination of Lipophilicity and Its Use as a Predictor of Blood-Brain Barrier Penetration of Molecular Imaging Agents..” *Molecular Imaging and Biology : MIB : the Official Publication of the Academy of Molecular Imaging* 5 (6) (November): 376–389.

Watson, M A, M Yamada, M Yamada, B Cusack, K Veverka, C Bolden-Watson, and E Richelson. 1992. “The Rat Neurotensin Receptor Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells Mediates the Release of Inositol Phosphates..” *Journal of Neurochemistry* 59 (5) (November): 1967–1970.

Wendy O Williams, Daniel K Riskin Kathleen M Mott. 2008. “Ultrasonic Sound as an Indicator of Acute Pain in Laboratory Mice.” *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* 47 (1) (January 1): 8.

Wheeler-Aceto, H, and A Cowan. 1991. “Buprenorphine and Morphine Cause Antinociception by Different Transduction Mechanisms..” *European Journal of Pharmacology* 195 (3) (April 3): 411–413.

White, Fletcher A, Hosung Jung, and Richard J Miller. 2007. “Chemokines and the Pathophysiology of Neuropathic Pain..” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (51) (December 18): 20151–20158. doi:10.1073/pnas.0709250104.

White, Jim F, Justin Grodnitzky, John M Louis, Loc B Trinh, Joseph Shiloach, Joanne Gutierrez, John K Northup, and Reinhard Grisshammer. 2007. “Dimerization of the Class a G Protein-Coupled Neurotensin Receptor NTS1 Alters G Protein Interaction..” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (29) (July 17): 12199–12204. doi:10.1073/pnas.0705312104.

Whitehead, Kathryn A, James E Dahlman, Robert S Langer, and Daniel G Anderson. 2011. “Silencing or Stimulation? siRNA Delivery and the Immune System.” *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* 2 (1) (July 15): 77–96. doi:10.1146/annurev-chembioeng-061010-114133.

Willer, J C, D Bouhassira, and D Le Bars. 1999. “[Neurophysiological Bases of the Counterirritation Phenomenon:Diffuse Control Inhibitors Induced by Nociceptive Stimulation]..” *Neurophysiologie Clinique = Clinical Neurophysiology* 29 (5) (October): 379–400. doi:10.1016/S0987-7053(00)87263-9.

Wilson, Alex W, Stephen J Medhurst, Claire I Dixon, Nick C Bontoft, Lisa A Winyard, Kim T Brackenborough, Jorge De Alba, et al. 2006. “An Animal Model of Chronic Inflammatory Pain: Pharmacological and Temporal Differentiation From Acute

Models..” *European Journal of Pain (London, England)* 10 (6) (August): 537–549. doi:10.1016/j.ejpain.2005.08.003.

Woolf, C J. 1983. “Evidence for a Central Component of Post-Injury Pain Hypersensitivity..” *Nature* 306 (5944) (December): 686–688.

Woolf, C J, P Shortland, and R E Coggeshall. 1992. “Peripheral Nerve Injury Triggers Central Sprouting of Myelinated Afferents..” *Nature* 355 (6355) (January 2): 75–78. doi:10.1038/355075a0.

Wu, Gang, Matthias Ringkamp, Beth B Murinson, Esther M Pogatzki, Timothy V Hartke, Himali M Weerahandi, James N Campbell, John W Griffin, and Richard A Meyer. 2002. “Degeneration of Myelinated Efferent Fibers Induces Spontaneous Activity in Uninjured C-Fiber Afferents..” *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 22 (17) (September 1): 7746–7753.

Xiao, Hua-Sheng, Qiu-Hua Huang, Fang-Xiong Zhang, Lan Bao, Ying-Jin Lu, Chao Guo, Liang Yang, et al. 2002. “Identification of Gene Expression Profile of Dorsal Root Ganglion in the Rat Peripheral Axotomy Model of Neuropathic Pain.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (12) (June 11): 8360–8365. doi:10.1073/pnas.122231899.

Xu, Bo, Giannina Descalzi, Hai-Rong Ye, Min Zhuo, and Ying-Wei Wang. 2012. “Translational Investigation and Treatment of Neuropathic Pain..” *Mol Pain* 8: 15. doi:10.1186/1744-8069-8-15.

Xu, Guang-Yin, Guangwen Li, Ningang Liu, and Li-Yen Mae Huang. 2011. “Mechanisms Underlying Purinergic P2X3 Receptor-Mediated Mechanical Allodynia Induced in Diabetic Rats..” *Molecular Pain* 7: 60. doi:10.1186/1744-8069-7-60.

Yamada, M, M Yamada, M A Watson, and E Richelson. 1993. “Neurotensin Stimulates Cyclic AMP Formation in CHO-rNTR-10 Cells Expressing the Cloned Rat Neurotensin Receptor..” *European Journal of Pharmacology* 244 (1) (January 4): 99–101.

Yamauchi, Rena, Soushi Sonoda, Yunden Jinsmaa, and Masaaki Yoshikawa. 2003. “Antinociception Induced by Beta-Lactotensin, a Neurotensin Agonist Peptide Derived From Beta-Lactoglobulin, Is Mediated by NT2 and D1 Receptors..” *Life Sciences* 73 (15) (August 29): 1917–1923.

Yang, Liang, Fang-Xiong Zhang, Fen Huang, Yin-Jing Lu, Guo-Dong Li, Lan Bao, Hua-Sheng Xiao, and Xu Zhang. 2004. “Peripheral Nerve Injury Induces Trans-Synaptic Modification of Channels, Receptors and Signal Pathways in Rat Dorsal Spinal Cord.” *The European Journal of Neuroscience* 19 (4) (February 1): 871–883.

Yin, H H, L Adermark, and D M Lovinger. 2008. “Neurotensin Reduces Glutamatergic Transmission in the Dorsolateral Striatum via Retrograde Endocannabinoid Signaling.” *Neuropharmacology*.

Zhang, X, L Bao, Z Q Xu, M Diez, P Frey, and T Hökfelt. 1996. “Peripheral Axotomy Induces Increased Expression of Neurotensin in Large Neurons in Rat Lumbar Dorsal Root Ganglia..” *Neuroscience Research* 25 (4) (August): 359–369.

Zhong, Haizhen A, Victoria Mashinson, Theodor A Woolman, and Mengyi Zha. 2013. “Understanding the Molecular Properties and Metabolism of Top Prescribed Drugs..” *Current Topics in Medicinal Chemistry* (May 9).