



UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR



ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE , DE LA SANTE ET DE L'ENVIRONNEMENT.

FACULTE DE MEDECINE , DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE

Année : 2015

N° 171

THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

Mention : Biologie, Nutrition et Pathologies Humaines

Spécialité : NEUROPHYSIOLOGIE

**EVALUATION DES EFFETS THERAPEUTIQUES DE *CLERODENDRUM FORMICARUM*
DANS UN MODELE ANIMAL DE DOULEUR NEUROPATHIQUE DIABETIQUE**

Présentée et soutenue publiquement par :

M. Ghislain LOUBANO-VOUMBI

Le mardi 22 décembre 2015.

JURY

Président :	M. Oumar	GAYE	Professeur Titulaire (UCAD)
Rapporteur :	M. Martin	DIATEWA	Professeur Titulaire (UMNG)
Rapporteur :	M. Moustapha	NDIAYE	Professeur Titulaire (UCAD)
Rapporteur :	M. Serge Niangoran	BAKOU	Maître de Conférences Agrégé (EISMV)
Examinatrice :	Mme Fatou Bintou	SARR	Maître de Conférences Agrégée (UFR SS-Thiès)
Directeur de thèse :	M. Abdoulaye	SAMB	Professeur Titulaire (UCAD)

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été effectué au Laboratoire de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar avec le soutien de l'IBRO (International Brain Research Organisation) et de la SONA (Société des Neuroscientistes Africains).

Je tiens tout d'abord à remercier sincèrement le Professeur Omar Gaye pour avoir accepté de Présider ce Jury. Toute ma reconnaissance.

J'adresse mes sincères remerciements aux Professeurs Martin Diatewa, Moustapha Ndiaye et au Maître de Conférences Agrégé, Serge Niangoran Bakou de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse.

Mes sincères remerciements, au Maître de Conférences Agrégée Fatou Bintou Sarr pour nous avoir honorés et acceptés d'examiner ce travail.

J'adresse mes remerciements les plus sincères au Professeur Abdoulaye Samb pour avoir accepté de m'encadrer, de me conseiller, corriger mes articles et ma thèse ; me motiver et m'orienter tout au long de ce travail. Toute ma gratitude cher Maître.

Je remercie également le Professeur Mbayang Ndiaye Niang de m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles de l'UCAD.

Merci à l'ensemble du personnel du Laboratoire de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles avec lequel j'ai partagé des moments enrichissants. Je tiens ici à vous exprimer toute ma gratitude et vous dire que j'ai beaucoup appris et pris confiance en moi à vos côtés.

Merci à toi Amadou Bop, Malick et Rhadim de nous avoir aidé dans les traitements de documents informatiques et de certaines tâches du Laboratoire. Toute ma gratitude.

Merci également à l'ensemble du personnel du Laboratoire de Pharmacologie du département de Pharmacie de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar.

J'ai une pensée particulière à Monsieur Césaire Mantina, Directeur de l'Hôpital de Référence de Dolisie qui a ménagé un effort particulier pour mon autorisation à faire cette thèse. Toute ma gratitude.

Je n'oublierais pas les encouragements de mon grand frère le Docteur Bernard Ndala et de son Epouse Michelvie. Toute ma gratitude.

Enfin, je tiens à remercier ma famille et mes amis particulièrement Jean-Bruno Loubano, Franck Gaétan Loubanou Tchibinda, Joséphine Loubano Mambou ,Odilon Mouamba Nzembe, Luc Magloire Anicet Boumba , Julien Dzoualou Pandi , Patric Sindika Loubota , Tite Moussoungou , Jean-Claude Loundou , Donatien Malivala et Love Nkaya pour leurs encouragements et leurs soutiens.

Merci à toi Patricia Bouaka Massoumou qui m'a soutenu financièrement dans la réalisation de cette thèse. Toute ma gratitude.

Merci à vous mes chers cadets particulièrement Gloire Deleffort Mapaga Ngoyi, Peya Laly, Guelad D'Almeida Mboukou Ngoma, Docteur Fabien Gaël Mouamba et Belganie Yamba Nkengue pour votre soutien.

A l'ensemble du personnel de l'Hôpital de Référence de Dolisie et en particulier ceux du Service de Laboratoire notamment François Mboungou-Niama, Elisabeth Ngali et Joséphine Bouanga. Toute ma reconnaissance.

A ma maman Jeanne Boumba-Voumbi, je tiens à te remercier pour tes encouragements.

Je n'oublierais pas les encouragements de mes enfants : Jordie, Jessie et Japhet Bénisse.

Enfin, un grand merci à ma tendre Epouse Madame Loubano-Voumbi née Judith Banzouzi Loumikou qui était devenue ma tutrice pendant ces 3 années de thèse. Tu es une Femme exceptionnelle et je te serais toujours reconnaissant.

ABREVIATIONS

AINS	: Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AMPA	: acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl) propanoïque.
ATP	: adénosine triphosphate
ACTH	: Hormone Adrenocorticotrophique.
A_{2A}R	: Récepteur à l'Adénosine de type A _{2A}
CCK	: Cholécystokinine
CCI	: Lésions chroniques
CD11b	: Cellule de Différentiation 11b
CMH	: Complexe majeur d'histocompatibilité.
COX 1 et 2	: Isoenzymes de cyclooxygénases 1 et 2
CR	: Récepteurs du complément
CX3CL1	: Fractalkine
ECF	: Extraits de feuilles de <i>Clerodendrum formicarum</i> .
ERK	: Signal de Régulation Extracellulaire de Kinase
FGF-2	: Fibroblast growth factor-2.
GABA	: Acide γ -aminobutyrique
GFAP	: Protéine acide fibrillaire gliale
GMP	: Guanylate monophosphate.
CGRP	: Peptide associé au gène de la calcitonine
GluR1 et GluR2	: Sous-unités du récepteur AMPA
IASP	: Association international pour l'Etude de la douleur.
IL	: Interleukine
IP3	: Inositol triphosphate
JNK	: c-Jun N-terminal kinase
MAPK	: MAP Kinase
MMP	: Métalloprotéinase matricielle.
NADPH	: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate d'hydrogène.
NMDA	: N-méthyl D-aspartate

NRM	: Noyau du raphé magnus.
NO	: Monoxyde d'Azote
OMS	: Organisation mondiale de la santé.
PCR	: Réaction en chaîne de Polymérase.
PGE2	: Prostaglandine E2.
P2X	: Récepteurs purinergiques ionotropiques
SCI	: Lésion de la moelle épinière
SRD	: Subnucleus reticularis dorsalis
SIDA	: Syndrome d'Immunodéficience Acquise.
SNARE	: Récepteur Soluble de N-Ethylmaleimide.
SNC	: Système nerveux central.
SP	: Substance P
TBS	: Tampon Salin de Tris
TNFα	: Facteur de nécrose tumorale
VIP	: Peptide vasoactif intestinal.
VPI	: Noyau ventropostéro-inférieur du thalamus latéral
VPL	: Noyau ventropostéro-latéral du thalamus latéral
VPM	: Noyau ventropostéro-médian du thalamus latéral

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Principales caractéristiques de la douleur nociceptive.....	9
Figure 2 : Principales caractéristiques de la douleur inflammatoire.....	10
Figure 3 : Principales caractéristiques des douleurs pathologiques : neuropathique et dysfonctionnelle.	11
Figure 4 : Les médiateurs périphériques après une stimulation thermique ou mécanique	14
Figure 5 : Le réflexe de retrait.....	16
Figure 6 : Anatomie de la voie de la douleur.....	21
Figure 7 : Contrôle segmentaire du « Gate control » (Théorie du portillon de Melzack et Wall).	23
Figure 8 : Des modifications au niveau périphérique, spinal et cortical dans la douleur neuropathique.	29
Figure 9 : Mécanisme de génération de la douleur neuropathique diabétique. ...	33
Figure 10 : Schéma des interactions neurones-Cellules gliales et Cellules gliales- gliales dans la moelle épinière.....	36
Figure 11 : Représentation schématique résumant l'implication des astrocytes au cours de la transmission synaptique de base.....	49
Figure 12: Microglie et maturation des synapses.....	57
Figure 14 : Distribution naturelle de l'espèce <i>Clerodendrum formicarum</i>	60
Figure 15 : feuilles de <i>Clerodendrum formicarum</i>	61
Figure 16 : Les filaments de Von Frey.....	66
Figure 17 : Algesimètre Ugo Basile.	67

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Comparaison entre Douleur aigüe et douleur chronique.....	7
Tableau II : Les différentes fibres nerveuses et leurs caractéristiques.....	13
Tableau III: Comparatif des différentes composantes des modèles lésionnels.....	42

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	1
PREMIERE PARTIE : GENERALITES	4
I. GÉNÉRALITÉS SUR LA DOULEUR.....	5
I.1. Définition.....	5
I.2. Classification.....	6
I.2.1. La douleur aiguë ou “douleur-symptôme”.....	6
I.2.2. La douleur chronique ou “douleur-maladie”.....	6
I.3. Mécanismes générateurs de la douleur.....	8
I.3.1. La douleur adaptative ou physiologique ou aiguë.....	8
I.3.2. La douleur non adaptative ou pathologique ou chronique.....	10
I.4. Physiopathologie de la douleur.....	11
I.4.1. Les nocicepteurs.....	12
I.4.2. Les fibres nociceptives.....	12
I.4.3. Les médiateurs périphériques.....	13
I.4.4. L’Etage médullaire.....	14
I.4.5. L’étage Supra-médullaire.....	19
I.5. Mécanismes de contrôle de la douleur.....	22
I.5.1. A la périphérie.....	22
I.5.2. A l’étage médullaire.....	22
I.5.3. A l’étage supra-médullaire.....	24
II. LA DOULEUR CHRONIQUE.....	25
II.1. Hyperalgésie primaire et sensibilisation périphérique.....	25
II.2. Hyperalgésie secondaire et sensibilisation centrale.....	25
II.3. La douleur neuropathique.....	26
II.3.1. Définition.....	26
II.3.2. Etiologie centrale et Périphérique.....	26
II.3.3. Mécanismes de base de la douleur neuropathique.....	27
II.4. La douleur neuropathique diabétique.....	30
II.4.1. La physiopathologie.....	30
II.4.2. Mécanisme de génération de la neuropathie diabétique douloureuse.....	31
II.4.2.1. Sensibilisation.....	31
II.4.2.2. Système nerveux sympathique.....	32
II.4.2.3. Rôle des canaux sodiques.....	32
II.4.2.4. Potentialisation à long terme.....	32

III.	LES VOIES DE SIGNALISATION DANS LA DOULEUR CHRONIQUE.....	33
III.1.	La phosphorylation de MAPK.....	33
III.2.	Régulation des récepteurs, des canaux, et les transporteurs dans les cellules gliales...	34
III.3.	Régulation de cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance, et des protéases dans la glie.....	34
III.4.	Interactions neurones-Cellules gliales et cellules gliales- gliales dans la douleur chronique.....	35
IV.	LE TRAITEMENT DE LA DOULEUR NEUROPATHIQUE.....	37
IV.1.	Traitement médicamenteux.....	37
IV.2.	Le traitement non médicamenteux.	38
IV.3.	Le traitement alternatif de la douleur neuropathique : la phytothérapie.....	39
V.	LES MODÈLES ANIMAUX DE DOULEUR NEUROPATHIQUE.....	40
V.1.	Les modèles lésionnels.....	41
V.2.	Les modèles chimiotoxiques.....	42
VI.	LES CELLULES GLIALES.....	44
VI.1.	Les Astrocytes.....	45
VI.1.1.	Définition.....	45
VI.1.2.	Les principaux rôles physiologiques.....	45
VI.2.	Les cellules microgliales.....	51
VI.2.1.	Définition.....	51
VI.2.2.	Principaux rôles physiologiques des microglies.....	52
VI.3.	Douleur neuropathique et réactivité gliale.....	57
VI.3.1.	Introduction.....	57
VI.3.2.	La réactivité gliale.....	58
	□ La réaction microgliale.....	58
	□ La réaction astrocytaire.....	58
VII.	<i>CLERODENDRUM FORMICARUM</i>	59
VII.1.	Description.....	59
VII.2.	Distribution géographique.....	60
VII.3.	Composition phytochimique.....	60
VII.4.	Propriétés médicinales et usages traditionnels.....	61
	DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL.....	62
I.1.	Animaux.....	63
I.2.	Composition analytiques alimentaires des rats.....	63
I.3.	Le Matériel végétal.....	63
I.4.	Préparation d'extraits de plante.....	64

I.5. Induction du diabète et administration des médicaments.....	64
I.6. Détermination de la toxicité générale.....	64
I.7. Principe de la réflectométrie et mesure de la glycémie.....	65
I.8. Prélèvement de la moelle épinière.	65
I.9. Etude comportementale.....	65
I.9.1. Test de Filaments de Von Frey.	66
I.9.2. Test de pression sur la patte.	67
I.10. Western Blot.	67
I.10.1. La Préparation des Échantillons.....	67
I.10.2. SDS-PAGE et détection de chimioluminescence.....	68
I.11. PCR à temps réel (RT-PCR).	68
I.12. ANALYSE STATISTIQUE.....	69
II. RESULTATS	70
Article 1 : Caractéristiques du modèle animal de la douleur neuropathique diabétique induite par l'alloxane monohydrate en voie sous-cutanée chez le rat.	71
Article 2 : Atténuation de l'allodynie et de l'hyperalgésie par les extraits de feuilles de <i>Clerodendrum formicarum</i> dans un modèle de rat de douleur neuropathique diabétique.....	80
Article 3 : Analyse moléculaire des effets de <i>Clerodendrum formicarum</i> dans un modèle animal de la douleur neuropathique diabétique chez le rat.	91
III. DISCUSSION GENERALE.	105
III.1. Discussion méthodologique.....	105
III.1.1. Modèle animal de la douleur neuropathique diabétique.....	105
III.1.2. Les tests comportementaux.	106
III.1.3. Méthodes de Biologie moléculaire.....	109
III.1.4. Choix d'utilisation des extraits de feuilles de <i>Clerodendrum formicarum</i>	110
III.2. Discussion des résultats.....	110
III.2.1. Rôle de l'hyperglycémie dans la pathogenèse de la douleur neuropathique diabétique.	110
III.2.2. L'Allodynie et l'hyperalgésie dans la douleur neuropathique diabétique.	111
III.2.3. Rôle des cellules gliales dans la douleur neuropathique diabétique.....	112
III.2.4. Effet des ECF sur les cellules gliales dans la douleur neuropathique diabétique.....	113
III.2.5. Rôle de la voie de signalisation de la cyclooxygénase dans la douleur neuropathique diabétique.	113
III.2.6. Effets des ECF sur la voie de signalisation de la cyclooxygénase.	114
CONCLUSION GENERALE	115
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	115

INTRODUCTION GENERALE

La prise en charge clinique efficace pour traiter la douleur neuropathique diabétique est la thérapie pharmacologique. Les options de traitement de la douleur neuropathique diabétique sont caractérisées par une efficacité limitée et une fenêtre thérapeutique étroite [Haslam et Nurmikko, 2008]. Les médicaments actuels englobent les anti-inflammatoires non- stéroïdiens, les opiacés, les antidépresseurs, les anticonvulsivants, en fonction de la nature et de l'ampleur de la douleur. Néanmoins, seulement 40 à 60% des patients obtiennent un soulagement de la douleur cliniquement significative [Edwards et al. 2008 ; Moulin et al. 2014].

Les traitements donnent généralement des résultats insatisfaisants à cause de nombreux effets secondaires et indésirables. Ces médicaments ne ciblent que les neurones, alors que la douleur peut être due à un dysfonctionnement des cellules non neuronales, dites gliales, localisées dans le cerveau et la moelle épinière [Ji et al. 2013].

Ce qui souligne la nécessité de trouver de nouveaux médicaments moins toxiques et des nouvelles cibles cellulaires et/ou moléculaires.

Longtemps utilisée dans la pharmacopée africaine pour soulager de nombreuses affections notamment le rhumatisme, la céphalée, les douleurs chroniques et l'épilepsie ; *Clerodendrum Formicarum* pousse comme un arbuste à lianes avec des rameaux pubescents, brunâtres et striés.[Kibungu Kembelo, 1984]. Il se développe dans les recrus forestiers et les jachères d'Afrique tropicale [Ali et al. 2010a et 2010b]. Il existe à ce jour peu d'étude scientifique sur cette plante. Les mécanismes d'action de cette plante restent à élucider et leur effet antalgique n'a jamais été scientifiquement prouvé. L'hypothèse d'une inhibition de la sensibilisation centrale des cellules nerveuses notamment les cellules gliales permettant de renforcer l'action périphérique et les contrôles inhibiteurs descendants pourraient être évoquées.

Au cours de ces deux dernières décennies, un regain d'attention a été développé sur l'implication des cellules non neuronales principalement les astrocytes et la microglie dans la genèse et le maintien des douleurs chroniques. Par conséquent, les molécules qui bloquent leur activation et la production de leurs médiateurs de signalisation pourraient être bénéfiques pour traiter les douleurs chroniques [Ji et al. 2013].

L'objectif général de ce travail est d'évaluer les effets de *Clerodendrum formicarum* dans un modèle animal de douleur neuropathique diabétique. Pour atteindre cet objectif, nous nous sommes fixés 4 objectifs spécifiques :

- Caractériser le modèle animal de douleur neuropathique diabétique à l'Alloxane monohydrate par voie sous-cutanée.
- Évaluer les effets de *Clerodendrum formicarum* sur l'Allodynie mécanique et l'hyperalgésie mécanique.
- Déterminer l'état de la réactivité des astrocytes et des cellules microgliales dans le traitement de la douleur neuropathique par *Clerodendrum formicarum*.
- Déterminer les effets de *Clerodendrum formicarum* sur certains médiateurs de la douleur et de l'inflammation, notamment la voie de cyclooxygénase.

Ainsi, après une revue de littérature sur les différents aspects physiopathologiques de la douleur neuropathique et sur l'implication des cellules gliales notamment les astrocytes et les cellules microgliales. Notre travail sera consacré dans un premier temps à la caractérisation du modèle animal de neuropathie diabétique douloureuse induite par l'Alloxane monohydrate par voie sous-cutanée. Dans un deuxième temps, nous allons évaluer les effets de *Clerodendrum formicarum* sur les symptômes de la douleur par approche comportementale. Enfin, nous déterminerons les effets de *Clerodendrum formicarum* sur les cellules gliales et sur la voie de signalisation de la cyclooxygénase qui est l'une de voie prépondérante impliquée dans l'inflammation et la douleur. A cet effet, nous allons déterminer l'expression de GFAP, CD11b, COX1 et COX2 par des techniques de biologie moléculaire notamment par Western Blot et PCR à temps réel.

PREMIERE PARTIE : GENERALITES

I. GÉNÉRALITÉS SUR LA DOULEUR.

I.1. Définition.

Les progrès récents en neurosciences fondamentales et cliniques suggèrent que le cerveau et la moelle épinière jouent un rôle central dans l'état de la douleur. La recherche sur la douleur, alimentée par des études de neuro-imagerie, ont engendré une transformation dans notre compréhension de la façon dont la douleur affecte le système nerveux central. En conséquence, la notion que les changements dans les systèmes sensoriels sont les processus prédominant dans la douleur a été remplacée par une conceptualisation de la douleur comme un état très complexe du système nerveux central dans lequel les modèles de l'activation du système sensoriel intégré sont inadéquats avec une activité dans d'autres systèmes du cerveau et de la moelle épinière, y compris les processus émotionnels, cognitifs et modulateurs [Greenspan et al. 2007 ; Yazdi-Ravandi et al 2013]. La douleur, de par sa nature complexe et éminemment subjective, échappe à toute définition trop formelle. L'Association Internationale pour l'Etude de la Douleur (IASP) s'y est tout de même risqué en la décrivant comme « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable liée à des lésions tissulaires réelles ou potentielles ou décrites en termes de telles lésions. » Cette définition vague à souhait tend à donner raison au médecin qui disait que la douleur est finalement « n'importe quoi identifié comme tel par le patient »... [Harden et al. 2010]. La définition de l'IASP attire tout de même l'attention sur le fait que la douleur possède deux composantes, l'une sensorielle et l'autre émotionnelle. La composante sensorielle, elle la partage avec les autres modalités sensorielles classiques (vision, audition, toucher, gustation et olfaction). C'est l'aspect discriminatoire qui permet à toute modalité sensorielle d'identifier la localisation et l'intensité d'un stimulus. Par contre, la composante émotionnelle, affective ou motivationnelle est celle qui nous fait ressentir subjectivement un inconfort et nous pousse à faire quelque chose pour l'arrêter, le réduire ou le fuir [Borsook, 2012].

I.2. Classification.

Jusqu'au début du XXe siècle, on assimilait la douleur à un symptôme de blessure ou de maladie et son expression n'était considérée que comme le signe d'appel d'une pathologie. C'est à René Leriche, Professeur au Collège de France, que l'on reconnaît le mérite d'avoir isolé dès 1936 la notion de douleur chronique, sévère et durable, comme une entité médicale propre, véritable "douleur-maladie", souvent plus insupportable et plus dégradante que la maladie qui lui a donné naissance. Depuis l'expression de ce concept, on distingue deux types de douleurs qui s'opposent point par point : il s'agit de la douleur aiguë et de la douleur chronique [McGreevy et al. 2011 ; Buchheit et al. 2012].

I.2.1.La douleur aiguë ou "douleur-symptôme".

C'est une douleur d'installation récente (< 3 mois), le terme « aiguë » caractérisant la durée et non pas l'intensité de la douleur. Il s'agit d'une sensation douloureuse soit transitoire, comme celle qui fait suite à un traumatisme modéré, soit plus durable, comme celle qui révèle une maladie ; dans ce cas, elle est réversible lorsque la lésion causale est traitée.

De très nombreuses maladies débutent par une douleur aiguë symptomatique. Cela tient au fait anatomique que la plupart de nos viscères sont entourés d'une tunique très richement innervée : la dure-mère pour le cerveau, le péricarde pour le cœur, la plèvre pour le poumon, le péritoine pour les viscères abdominaux. Toutes ces douleurs aiguës d'origine viscérale sont considérées comme "utiles" car elles avertissent l'individu du développement d'une lésion interne. Une fois passée la phase aiguë lorsque la douleur persiste, alors que la lésion génératrice traumatique ou pathologique est résolue ou traitée, elle est dite chronique [Buchheit et al. 2012 ; Kyranou et Puntillo , 2012 ; Melissa et al. 2012].

I.2.2.La douleur chronique ou "douleur-maladie".

Il s'agit maintenant d'un syndrome clinique, véritable maladie à part entière, distincte de la douleur aiguë. Elle se caractérise notamment par la longueur de sa durée d'évolution (conventionnellement supérieure à 3 mois), mais surtout par l'ensemble

des répercussions psychologiques plus ou moins sévères qu'elle entraîne, sur l'humeur et les activités (physiques, professionnelles, sociales et familiales) et sur le comportement du patient et sa qualité de vie. Toute douleur persistante est en fait la conséquence d'un double échec : impossibilité à supprimer sa cause initiale et échec du traitement symptomatique de la douleur. Faire la différence entre une douleur "symptomatique" et une douleur "maladie" est essentiel (tableau 1).

Dans les douleurs chroniques d'étiologies multiples non homogènes, il faut distinguer :

- Les douleurs liées à une pathologie évolutive d'origine maligne (cancer, SIDA, ...) mais aussi bénigne (certaines pathologies rhumatismales). Leur mécanisme générateur est un excès de nociception.
- Les douleurs liées à une pathologie séquellaire non ou peu évolutive, d'origine bénigne, telle qu'une lésion nerveuse périphérique et/ou centrale. Leur mécanisme est généralement neuropathique [Melissa et al. 2012].

Tableau I: Comparaison entre Douleur aigüe et douleur chronique.

Caractéristiques	Douleur aigüe (symptôme)	Douleur Chronique (Maladie)
Finalités biologiques	Utile-Protectrice. Signal d'alarme.	Inutile-Destructrice. Maladie à part entière.
Durée	Transitoire (<3 mois) Réversible si lésions traitées	Répétitive ou durable (> 3 mois). Persistante et lésion séquellaire
Mécanisme générateur	Essentiellement nociceptif et inflammatoire.	Nociceptif- Neuropathique Dysfonctionnelle- Psychogène.
Composante affective	Anxiété	Dépression Auto-aggravation- spontanée.

I.3. Mécanismes générateurs de la douleur.

I.3.1. La douleur adaptative ou physiologique ou aigüe.

On peut distinguer premièrement la **douleur nociceptive**, ressentie lorsque nous détectons, comme son nom l'indique, une stimulation nociceptive mécanique, chimique, ou thermique, menaçant notre intégrité physique. Cette douleur physiologique est considérée comme un système d'alerte précoce indispensable non seulement pour détecter mais également minimiser le contact avec le stimulus nociceptif, et ainsi assurer la survie et le bien être de l'organisme. Le caractère essentiel de cette douleur est dramatiquement illustré chez les personnes présentant une insensibilité congénitale à la douleur. Dans cette pathologie, le patient est incapable de détecter les stimuli nociceptifs qu'ils soient environnementaux (mécanique, chimique, thermique) ou internes relatifs à des blessures (tels que des fractures osseuses), avec les conséquences, parfois même mortelles, que nous pouvons imaginer pour l'individu [Basbaum et al. 2009]. Par conséquent, afin d'assurer son rôle de sentinelle et de protéger l'organisme des lésions réelles ou imminentes que pourraient induire les stimuli nociceptifs, cette douleur se caractérise par un seuil nociceptif élevé lui permettant de différencier les stimuli potentiellement dangereux (de forte intensité), des stimuli inoffensifs (de faible intensité), et ainsi de ne déclencher une réponse comportementale adaptée, le réflexe de retrait (réflexe moteur spinal non conscient) qu'en situation où l'évitement immédiat du stimulus considéré comme nociceptif est indispensable à la protection [Woolf, 2010] (Figure 1).

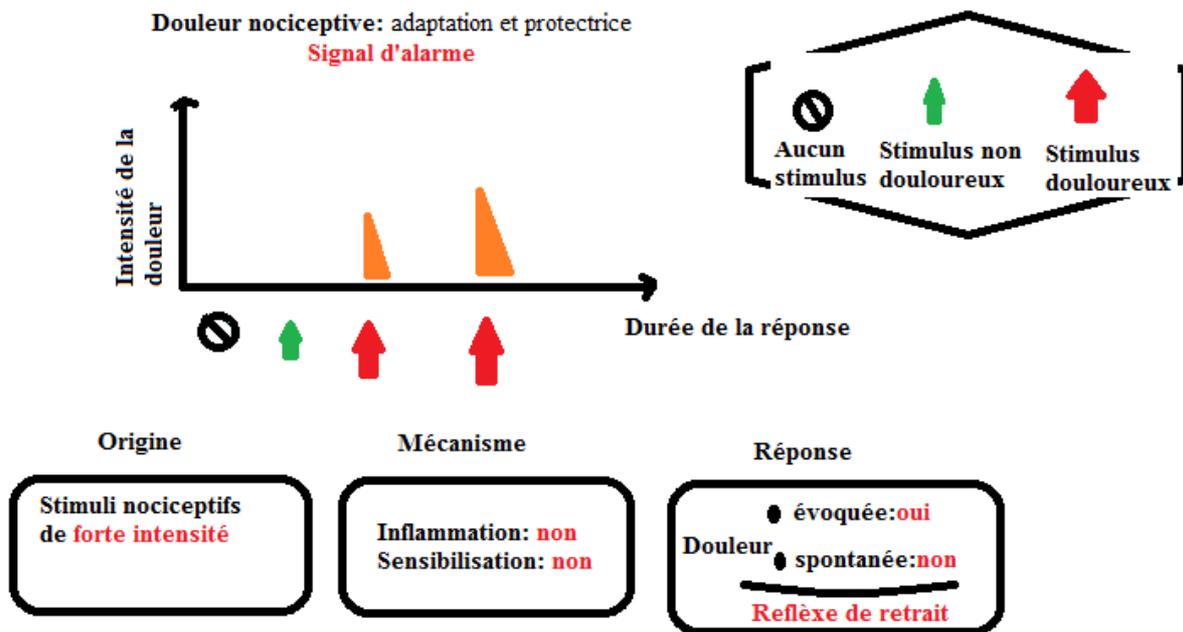


Figure 1 : Principales caractéristiques de la douleur nociceptive.

Douleur adaptative considérée comme un signal d'alarme, évoquée par des stimuli nociceptifs de forte intensité, sans lésion et/ou inflammation du système nerveux [Costigan et al. 2009 ; Woolf, 2010].

Le deuxième type de douleur également considérée comme étant adaptative et protectrice est la **douleur inflammatoire**, provoquée par l'activation du système immunitaire lors de blessures et/ou d'infections des tissus. Tout comme la douleur nociceptive, cette douleur inflammatoire a pour but la protection de l'intégrité physique. En renforçant la sensibilité sensorielle après une lésion tissulaire inévitable (comme celles pouvant être induites lors de certaines chirurgies) ou accidentelle, cette douleur favorise la récupération de la partie du corps atteinte en créant un environnement d'hypersensibilité désagréable qui décourage le contact physique et le mouvement, réduisant ainsi les risques de dommages supplémentaires [Woolf, 2010] (Figure 2).

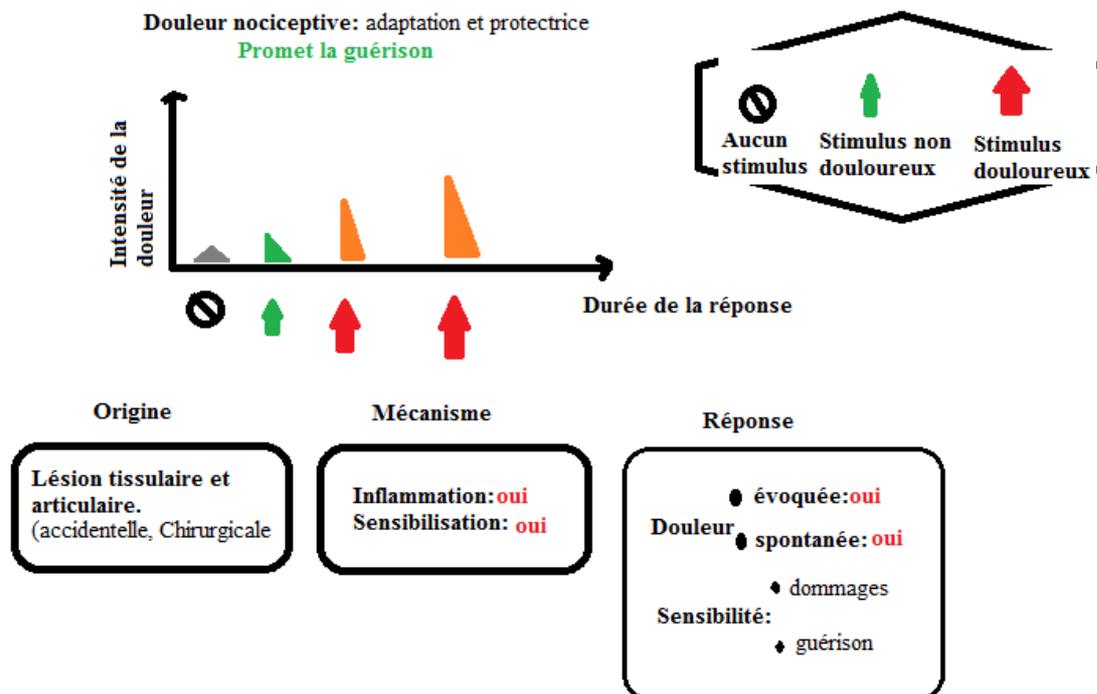


Figure 2 : Principales caractéristiques de la douleur inflammatoire.

Douleur adaptative évoquée par des stimuli de forte et faible intensité, caractérisée par un état inflammatoire actif de la région lésée à protéger et à réparer [Costigan et al., 2009 ; Woolf, 2010].

I.3.2. La douleur non adaptative ou pathologique ou chronique.

Cette douleur contraste avec les douleurs nociceptive et inflammatoire par le fait qu'elle est non adaptative, non protectrice, et décrite comme un état pathologique résultant du fonctionnement anormal du système nerveux central. Ce dysfonctionnement provoque une amplification des signaux sensoriels conférant à cette douleur pathologique un seuil nociceptif bas. Cette douleur pathologique peut apparaître après une lésion du système nerveux central ou périphérique avérée, mais aussi en l'absence de stimulus nociceptif et lorsque aucun dommage tissulaire et/ou inflammatoire n'est constaté (les douleurs dysfonctionnelles comme par exemple la fibromyalgie ou le syndrome du côlon irritable). Cette douleur doit être perçue comme un faux signal d'alarme produit par l'organisme et causé par un dysfonctionnement du système nerveux lui-même [Woolf, 2010] (Figure 3).

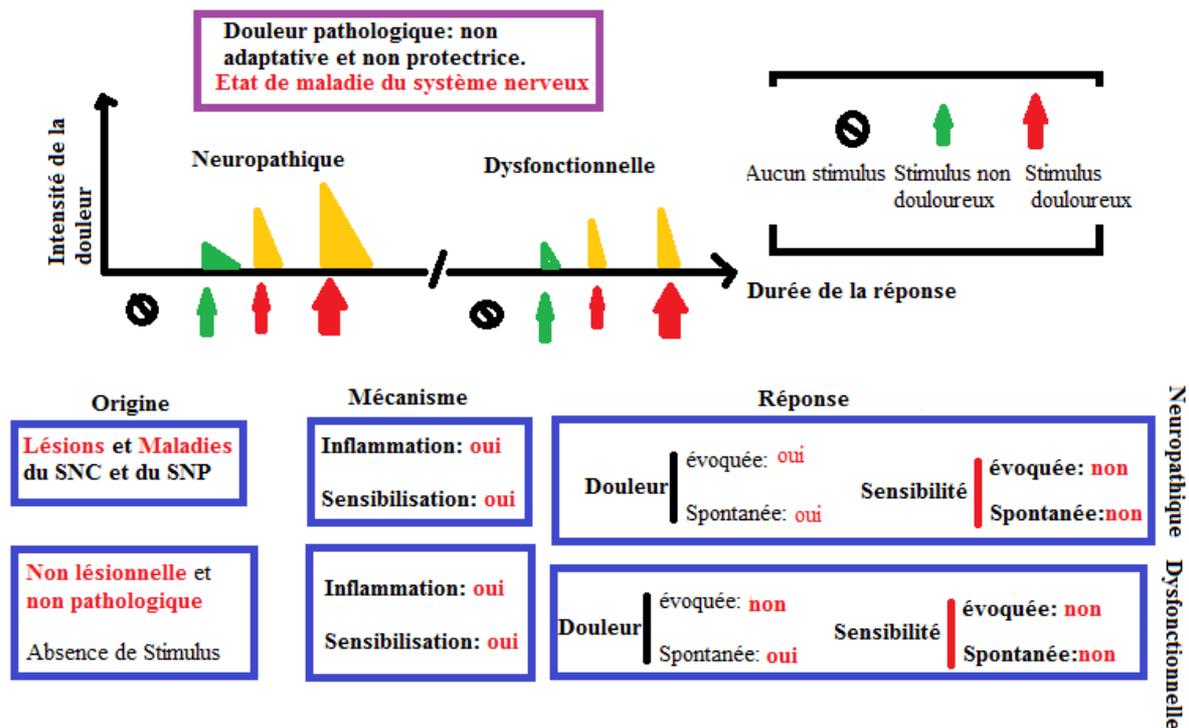


Figure 3 : Principales caractéristiques des douleurs pathologiques : neuropathique et dysfonctionnelle.

Ces douleurs sont non adaptatives et non protectrices, évoquées par des stimuli de forte et faible intensité, caractérisées par un état hypersensibilité indépendant de la lésion ou de la pathologie [Costigan et al. 2009 ; Woolf, 2010].

I.4. Physiopathologie de la douleur.

Le message nociceptif part de la périphérie au niveau de nocicepteurs, chemine le long des fibres nerveuses de petits calibres, puis pénètre à l'étage médullaire. Ensuite il va monter le long de la moelle épinière et informer le tronc cérébral, l'hypothalamus et le thalamus, le système limbique et le cortex cérébral (Figure 6). Ceci va permettre une analyse de ce message pour en reconnaître ses composantes et pouvoir y répondre autant au niveau comportemental que physiologique. En effet, tout au long de ce trajet, il existe des points de modulation de ce message et au niveau supérieur des possibilités d'amorcer une lutte contre ce phénomène douloureux par le biais de voies descendantes [Ruscheweyh et al. 2011].

I.4.1. Les nocicepteurs

Ce sont des terminaisons libres des fibres nerveuses sensibles. L'activation de ces structures se fait par des stimulations thermiques, chimiques, électriques ou mécaniques. Les fibres concernées par ces activations ne sont pas spécifiquement dévolues à la nociception. Les stimuli partent de la peau, des viscères, des muscles et des articulations. Ces nocicepteurs sont dits polymodaux, ils peuvent le plus souvent être activés par différents stimuli générateurs de douleur [Dubin et Patapoutian, 2010 ; Han et al. 2013]. Le message nociceptif prend naissance grâce à la modification de la perméabilité des membranes qui engendre un potentiel d'action qui va se propager le long de la fibre nerveuse jusqu'à la moelle. Des nocicepteurs unimodaux qui ne sont activés que par des stimulations mécaniques intenses : ce sont des mécanonocicepteurs électivement en relation avec les fibres $A\delta$. La répartition des nocicepteurs est homogène au niveau de la peau, ce qui permet une bonne localisation de la douleur, malgré le chevauchement de leur champ de perception. Par contre, la répartition dans les autres tissus est moins bien organisée, ce qui explique les difficultés de localisations de douleurs d'origines plus profondes. Les viscères sont, en général sensibles, à la traction, à la distension et au spasme et insensibles à la pression, à la coupure et à la brûlure [Justins, 1996].

I.4.2. Les fibres nociceptives.

Elles conduisent le message douloureux et sont de petit diamètre. En effet, les nerfs afférents sont constitués de nombreuses fibres de différents calibres : les fibres $A\alpha$ et $A\beta$, entourées de myéline, à conduction rapide transmettent la sensation tactile, proprioceptive. Les fibres $A\delta$, myélinisées et de petit diamètre, à conduction lente, transmettent des informations mécaniques et thermiques. Ces fibres sont responsables de la première sensation au cours d'un phénomène douloureux, qui est bien localisée ("épi-critique"), à type de piqûre. Les fibres C, de très petit diamètre, amyéliniques, à conduction très lente, transmettent la douleur à type de brûlure. D'apparition plus tardive, cette sensation est aussi plus diffuse [Besson et Chaouch, 1987 ; Ringkamp et al. 2011].

Tableau II : les différentes fibres nerveuses et leurs caractéristiques.

Type de fibre nerveuse	Information véhiculée	Gaine de myéline	Diamètre (micromètre)	Vitesse de conduction (m/s)
A-alpha	Proprioception	Myélinisée	13-20	80-120
A-Beta	Toucher	Myélinisée	6-12	35-90
A-delta	Douleur (mécanique et thermique)	Myélinisée	1-5	5-40
C	Douleur (mécanique, thermique et chimique)	Non-myélinisée	0,2-1,5	0,5-2

I.4.3. Les médiateurs périphériques.

Les stimulations thermiques et mécaniques activent directement les nocicepteurs. Les lésions traumatiques, inflammatoires ou ischémiques vont provoquer la libération par les tissus lésés de substances chimiques. Ces substances pourront, soit activer directement les nocicepteurs et sont dites algogènes, soit sensibiliser les nocicepteurs à d'autres stimuli.

Parmi les substances algogènes, la bradykinine est la plus connue et étudiée. On retrouve également les ions potassium, hydrogène et l'oxyde nitrique, ainsi que l'histamine et la sérotonine. Les prostaglandines et probablement les leucotriènes, jouent plutôt un rôle de sensibilisateurs des nocicepteurs à l'action d'autres substances. Ceci explique l'hyperalgie dans les phénomènes inflammatoires et l'action antalgique des anti-inflammatoires non stéroïdiens. Parmi les peptides impliqués dans la transmission du message douloureux, la substance P est la plus connue, car elle a été la première découverte. Elle semble jouer un rôle primordial dans la nociception. Elle a une action vasodilatatrice à l'origine de l'inflammation algogène. Il existe d'autres neuropeptides en cause dans ces phénomènes, comme le peptide associé au gène de la calcitonine (CGRP) et la neurokine A et probablement d'autres dont les actions ne sont

pas encore élucidées comme la somatostatine, le peptide intestinal vaso-actif du cordon postérieur(VIP). Plus récemment, l'adénosine s'est révélée être un neuromédiateur important. Elle active directement les terminaisons libres non myélinisées. Elle a aussi une action indirecte en modulant la libération des médiateurs par les mastocytes (histamine, cytokines). (Figure 4) [Barton et al. 2005 ; Biel et al. 2009 ; He et al. 2010].

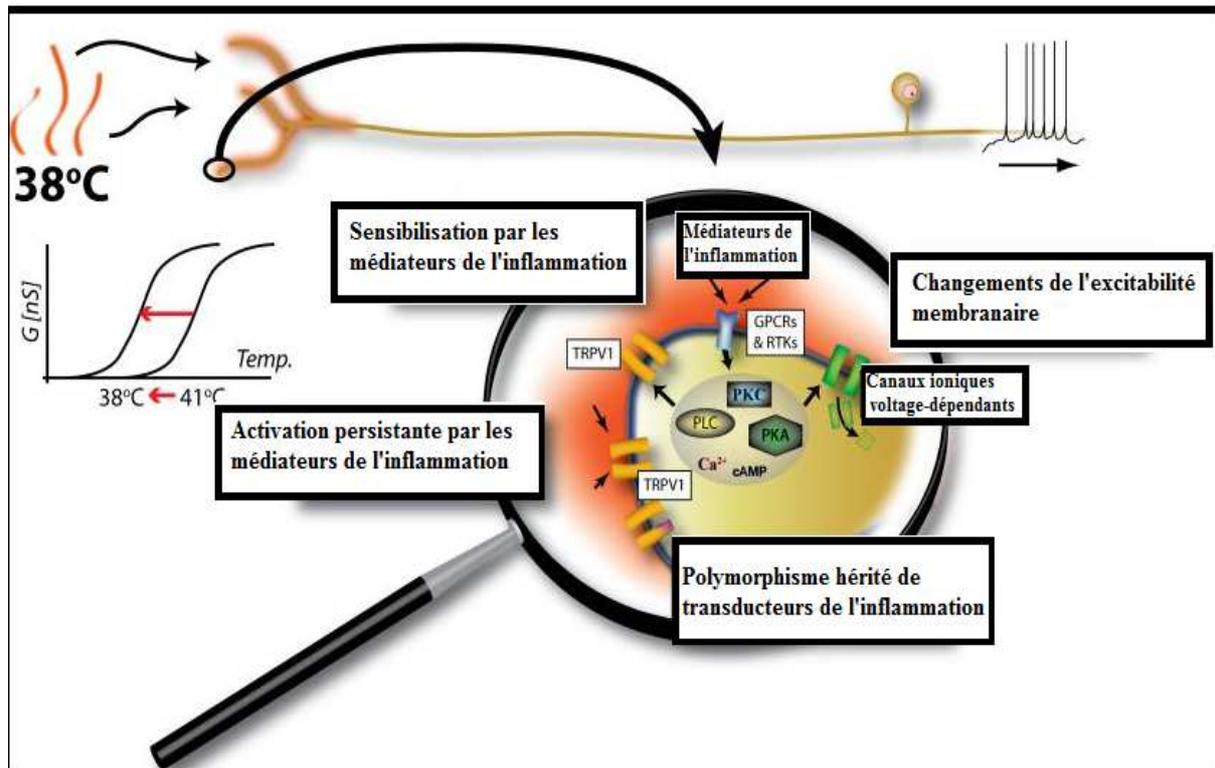


Figure 4 : les médiateurs périphériques après une stimulation thermique ou mécanique [He et al. 2010].

I.4.4. L'Etage médullaire.



Les corps cellulaires des fibres nociceptives.

Les corps cellulaires des fibres nociceptives sont situés dans les ganglions rachidiens. La grande majorité de ces fibres pénètrent dans la moelle épinière par la racine postérieure en émettant des collatérales dans le tractus de Lissauer, qui se distribuent sur plusieurs niveaux.

Les fibres de petits calibres font relais au niveau des couches de Rexed, soit directement avec le deuxième neurone en particulier dans la couche V, soit avec des

inter-neurones dans les couches I (zone marginale de Waldeyer) et II (substance gélatineuse de Rolando). Les fibres d'origine viscérale se distribuent sur les couches I, V, VII et X, alors que les fibres d'origine musculaire, se distribuent sur les couches I, V et VI.

Ce deuxième relais peut être uniquement nociceptif mais il peut aussi être la convergence de nombreuses autres informations. C'est le cas au niveau de la couche V qui reçoit des influx de toutes les fibres qui proviennent à la fois des zones cutanées et viscérales et qui est à l'origine des douleurs projetées [Chen et Larivière, 2010 ; Higgins et al. 2013].

❖ **Les voies ascendantes de petits calibres.**

Le deuxième neurone part de la moelle. La majorité croise la ligne médiane par la commissure grise antérieure pour cheminer dans le cordon antérolatéral controlatéral (faisceau en croissant de Déjeurine). Une petite partie va rester du même côté et va cheminer dans le cordon ipsi-latéral. Il existe plusieurs faisceaux, la plupart sont mixtes, c'est à dire à composantes somatique et viscérale, seulement un d'entre eux est somatique pur mais son existence même est contestée chez l'homme.

- les faisceaux spino-thalamiques (néo- et paléo-) ont pour origine les couches I, IV-VIII, de Rexed, ils cheminent dans le cordon antérolatéral controlatéral ;
- les faisceaux spino-réticulaires ont pour origine les couches I, IV-VI, VII-VIII, et cheminent dans le cordon antérolatéral contro- et ipsi-latéral ;
- les faisceaux spino-ponto-mésencéphaliques ont pour origine les couches I, IV-VI et cheminent dans le cordon antérolatéral et le funiculus postéro-latéral ;
- les faisceaux spino-solitaires ont pour origine les couches I, V et X et chemine dans le cordon antérolatéral ;
- enfin le faisceau spino-cervical (de Morin), contesté chez l'homme [Walter et al. 2009 ; Niu et al. 2013]

❖ **Les voies ascendantes de gros calibres.**

Les voies ascendantes de gros calibres transportant, le message proprioceptif et tactile, pénètrent également dans la moelle par la corne postérieure mais ne font pas relais à ce niveau. Elles cheminent directement vers les centres supérieurs par le cordon postérieur ipsi-latéral (faisceau gracile et cunéiforme - Goll et Burdach) mais elles laissent, au passage, des collatérales dans les différentes couches de la substance grise postérieure de la moelle (Figure 5) [Chomsung et al. 2010 ; Perge et al. 2012].

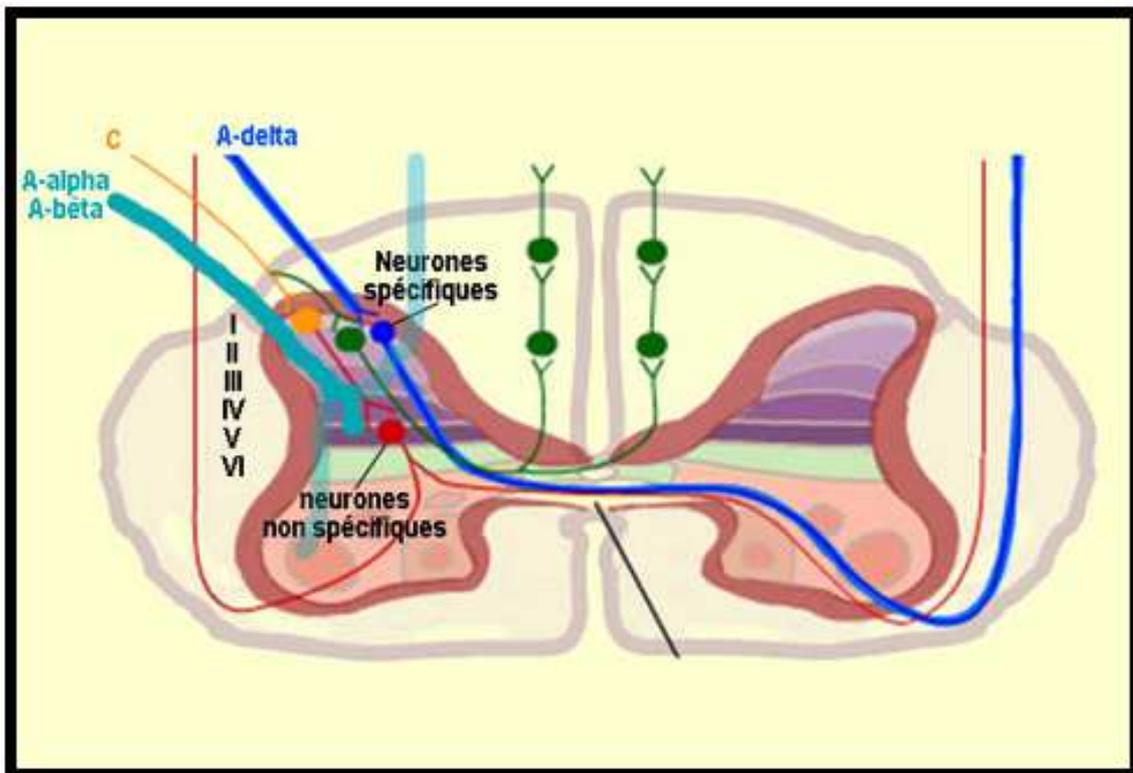


Figure 5 : Le réflexe de retrait.

Ainsi les fibres de gros calibre myélinisées (A α pour le toucher et A β pour la proprioception) qui montent directement dans la colonne dorsale ipsilatérale de la moelle épinière, vont tout de même envoyer certains axones dits « collatéraux » vers les couches profondes de la corne dorsale qui s'étendent jusqu'à la corne ventrale [d'après Perge et al. 2012].



Neuromédiateurs et neuromodulateurs.

La transmission de l'influx nerveux se fait grâce à des neuromédiateurs. Les neurotransmetteurs libérés à cette première synapse ont fait l'objet de nombreuses recherches: plus d'une vingtaine de substances sont potentiellement libérées à ce niveau. Outre l'adénosine triphosphate (ATP) dont il a déjà été question en périphérie, ces substances sont classées en deux groupes: les acides aminés excitateurs d'une part et les peptides d'autre part.

➤ Acides aminés excitateurs.

La corne postérieure de la moelle est riche en glutamate et en récepteurs du glutamate. La stimulation électrique ou chimique des fibres afférentes primaires déclenche une libération de glutamate et d'aspartate dans les couches superficielles de la moelle. Les récepteurs au glutamate sont répartis en deux grandes familles: les récepteurs ionotropiques et les récepteurs métabotropiques.

Les récepteurs ionotropiques (c'est-à-dire, liés à un canal ionique) sont subdivisés selon leurs ligands en récepteurs au N-méthyl-D-Aspartate (NMDA), au Alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxalone propionate-AMPA/Kainate. Ces récepteurs sont actuellement clonés. Le récepteur NMDA a particulièrement retenu l'attention; à l'état basal, ce récepteur est inactif car son canal ionique est obstrué par les ions magnésium; suite à un stimulus nociceptif intense et répété ou soutenu, la dépolarisation du neurone conduit à l'ouverture du canal ionique et à une entrée massive de calcium dans la cellule qui contribue en fin de compte, à l'accélération de la dépolarisation. On conçoit facilement que le récepteur NMDA soit impliqué dans les mécanismes centraux d'hyperalgésie. La kétamine est un antagoniste non spécifique des récepteurs de type NMDA, ce qui explique ses propriétés analgésiques dès les faibles doses, bien inférieures à celles utilisées en anesthésie.

Les récepteurs «métabotropiques», liés à une protéine G, sont couplés à la phospholipase C ou à l'adényl cyclase. Ces récepteurs contrôlent l'activation de nombreux «seconds messagers» intracellulaires, qui ne sont d'ailleurs nullement spécifiques de la nociception : entrée de calcium dans la cellule, production d'inositol

triphosphate (IP3) et de diacylglycérol. Il s'ensuit toute une cascade d'événements dont l'activation de l'oxyde nitrique synthétase puis de la guanylate cyclase, entraînant la synthèse de NO et de (GMPc) intracellulaire. Le NO participe à des modifications géniques et vraisemblablement à l'activation des gènes à expression immédiate.

➤ **Peptides et transmission synaptique.**

De nombreux peptides sont présents dans les fibres périphériques afférentes et dans les couches superficielles de la moelle. Parmi ces peptides, le plus étudié est la substance P. Décrite par Von Euler et Gaddum dès 1931 comme agent vasodilatateur, et identifiée en 1970, la substance P (SP) est un peptide de 11 acides aminés appartenant au groupe neurokinine de la famille des tachykinines. La substance P agit préférentiellement sur les récepteurs à la neurokinine de type NK1 tandis que les neurokinines A et B sont plus sélectives des récepteurs NK2 et NK3. Les gènes de ces trois récepteurs ont été clonés. Des données suggéraient que la SP était un neuromédiateur excitateur au niveau des terminaisons des fibres afférentes fines, mais ce rôle est aujourd'hui controversé car la SP n'est ni nécessaire ni suffisante pour provoquer une douleur. C'est pourquoi ce neuropeptide apparaît plus aujourd'hui comme un neuromodulateur que comme neurotransmetteur de la transmission des influx nociceptifs.

Le CGRP (Calcitonin gene-related peptide) est un peptide de 37 acides aminés qui dérive du même gène que la calcitonine. Plusieurs arguments sont en faveur de son rôle excitateur dans la transmission des messages nociceptifs au niveau spinal. Au niveau médullaire, le CGRP n'est en effet présent que dans les fibres afférentes primaires; sa libération est augmentée lors de l'application d'une stimulation nociceptive; il potentialise les effets excitateurs de la SP. De nombreux autres peptides sont colocalisés dans les fibres afférentes primaires et sont libérés lors de stimulations nociceptives Somatostatine, cholécystokinine (CCK), neuropeptide FF, neurokinine A, peptide intestinal vasoactif (VIP), arginine-vasopressine, ocytocine, peptide libérant de la gastrine (GRP), galanine, angiotensine II, hormone corticotrope (ACTH), dynorphine, enképhalines sont autant de substances qui, outre leurs effets propres, modulent les effets des neuromédiateurs à la première synapse des voies nociceptives.

A ces substances, il faut ajouter d'autres neuromodulateurs agissant à l'étage spinal: les amines d'origine supraspinale, l'acide gamma amino-butyrique (GABA) l'acétylcholine et l'adénosine. S'il était nécessaire, ces aspects neuropharmacologiques apportent des éléments supplémentaires à l'idée que la corne postérieure de la moelle est bien plus qu'un simple connecteur entre la périphérie et le cerveau.

La biologie moléculaire a permis d'accélérer la connaissance des mécanismes cellulaires durant la dernière décennie. Un grand nombre de récepteurs des neuromodulateurs cités précédemment sont déjà clonés.

I.4.5. L'étage Supra-médullaire. (Figure 6)

❖ Les grosses fibres du cordon postérieur.

Les grosses fibres du cordon postérieur se terminent dans les noyaux gracile et cunéiforme du bulbe inférieur. Un deuxième neurone rejoint le thalamus ventro-postéro-latéral, après avoir croisé la ligne médiane par les lemnisques médians. De là, l'information suit le troisième neurone jusqu'au cortex somesthésique. Ce faisceau est responsable de la sensibilité tactile et kinesthésique, il transfère, sans les modifier des renseignements sur la topie, les modalités, l'intensité et la durée des stimulations périphériques [Kilgore et Bhadra, 2014].

❖ Pour les petites fibres.

➤ Les faisceaux spino-thalamiques.

Le deuxième neurone se termine dans le thalamus latéral pour le néo et transmet une somatotopie assez précise à conduction rapide. Pour le paléo, il se termine dans le thalamus médian et donne une somatotopie plus précaire, mais conduit la sensibilité douloureuse. Les deux faisceaux laissent des collatérales à la substance réticulée et à tous les niveaux du névraxe [Liu et al. 2009].

➤ Les faisceaux spino-réticulaires et spino-mésencéphaliques.

Le deuxième neurone va se terminer dans la substance réticulée du tronc cérébral (noyau gigantocellulaire (NGC), réticulaire latéral et subnucleus reticularis dorsalis (SRD) pour le premier, et dans la substance grise périaqueducale (SGPA) et l'aire

parabrachiale pour le deuxième. La projection sur le cortex à partir de la réticulée est bilatérale. Ils informent sur le caractère nociceptif du message [Boger et al. 2013],

➤ **le faisceau spino-solitaire.**

Il aboutit au noyau du tractus solitaire du bulbe qui reçoit également des afférences vagales et intervient dans la mise en jeu des réponses neurovégétatives [Zarucco et al. 2010].

❖ **Le troisième neurone.**

➤ **Les relais bulbaires et ponto-mésencéphaliques.**

Au niveau de la réticulée, le NGC, par ses projections sur le thalamus médian joue un rôle sur les mécanismes d'éveil, par ses projections descendantes et sur le noyau du Raphé Magnus joue un rôle important sur les contrôles inhibiteurs de la nociception (bulbo-spinaux et -spino- bulbo -spinaux) ; mais il semble qu'il ait également un rôle facilitateur de la transmission douloureuse. Le SRD a aussi un rôle dans les boucles BSP, et dans les aspects moteurs, émotionnels et neurovégétatifs de la douleur par ses projections ascendantes sur l'aire para-brachiale et le thalamus latéral. On peut exclure toute fonction discriminative de la formation réticulée par le fait que ses neurones sont le siège d'une convergence d'information de tous les territoires et par des afférences qui ne sont pas uniquement nociceptives.

L'aire para-brachiale a pour cible majeure le noyau central de l'amygdale. Son rôle semble être dans les processus moteurs, émotionnels et neurovégétatifs liés à la douleur [Kilgore et Bhadra, 2010 ; Boger et al. 2013].

➤ **Les relais thalamiques.**

Le thalamus latéral (le VPL en particulier) se projette sur le cortex somato-sensoriel et détermine ainsi la composante sensori-discriminative de la douleur (intensité et somatotopie).

Le thalamus médian reçoit des afférences de la moelle directe ou indirecte par la réticulée et se projette sur les aires corticales motrices, prémotrices et fronto-orbitales.

Il participe à l'élaboration des réactions motrices et émotionnelles à la douleur [Besson et al. 1988 ; Ochoa, 1982].

❖ Les relais corticaux

Il n'existe pas de zone spécifique dévolue à la nociception. Le cortex intègre l'expression affective et le transforme en souffrance. Il permet l'expression cognitive de la réaction psychologique à la douleur en fonction des expériences antérieures, de la personnalité de l'héritage culturel. C'est le lieu où vont s'exercer les suggestions. C'est le lieu de transformation en langage [Laurent et Ollagnon-Roman, 1989].

❖ Les autres relais centraux.

Les structures concernées sont le rhinencéphale, l'hypothalamus qui est lié au rhinencéphale et au système limbique et commande le système nerveux autonome et les sécrétions hypophysaires et entraîne des réactions végétatives communes à toute émotion douloureuse [Laurent et Ollagnon-Roman, 1989]

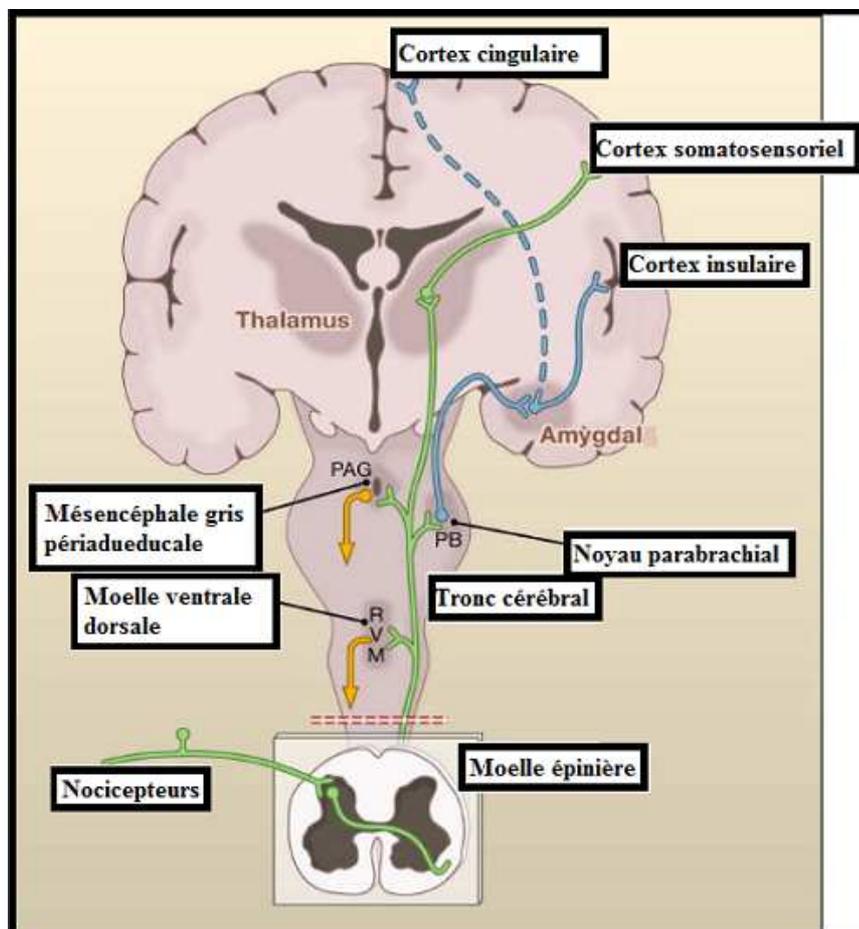


Figure 6 : Anatomie de la voie de la douleur.

Les nocicepteurs afférents primaires transmettent des informations nocives pour les neurones de projection dans la corne dorsale de la moelle épinière. Un sous-ensemble de ces neurones de projection transmet des informations vers le cortex somatosensoriel via le thalamus, fournissant des informations sur la localisation et l'intensité du stimulus douloureux. Autres neurones de projection engagent la cingulaire et le cortex insulaire via des connexions dans le tronc cérébral (noyau parabrachial) et l'amygdale, contribuant à la composante affective de l'expérience de la douleur. Cette information ascendante accède également les neurones de la moelle ventrale rostrale et le mésencéphale gris périaqueducal qui vont s'engager la décroissance des systèmes de rétroaction qui régulent la sortie de la moelle épinière [Trafton et Basbaum, 2000].

I.5. Mécanismes de contrôle de la douleur.

Les voies nociceptives afférentes, relativement spécifiques, sont en permanence modulées par des systèmes régulateurs, essentiellement inhibiteurs, au niveau de leurs divers relais du système nerveux central (corne dorsale spinale, tronc cérébral, thalamus...). Cette modulation s'exerce par l'intermédiaire des informations sensorielles non douloureuses et des structures supra spinales.

I.5.1. A la périphérie.

Les endomorphines interviennent comme inhibiteurs de sécrétion de substance P de façon certaine et il existe probablement d'autres mécanismes non encore identifiés [Kim et al. 2013].

I.5.2. A l'étage médullaire.

Il existe déjà une modulation du message douloureux. Il s'agit du système dérivé du contrôle du portillon ou de la porte (" Gate Control "). Les collatérales des grosses fibres bloquent l'arrivée du message plus spécifiquement douloureux et plus lent des petites fibres. Cette inhibition se fait par l'intermédiaire des inter-neurones de la substance gélatineuse et persiste tant que le message est faible. Cette propriété est utilisée en thérapeutique avec la neurostimulation transcutanée, la cryothérapie et

l'acupuncture, qui vont avec des faibles stimulations, activer les grosses fibres: c'est la contre-stimulation. Cette contre stimulation a aussi une origine supra segmentaire par stimulation des contrôles inhibiteurs descendants. Il existe probablement plusieurs substances responsables de ces phénomènes d'inhibition mais on sait déjà que les inter-neurones sécrètent des endomorphines qui diminuent la sécrétion de substances excitatrices (Figure 7) [Nathan et Rudge, 1974 ; Melzack et Wall, 1965 et 1976].

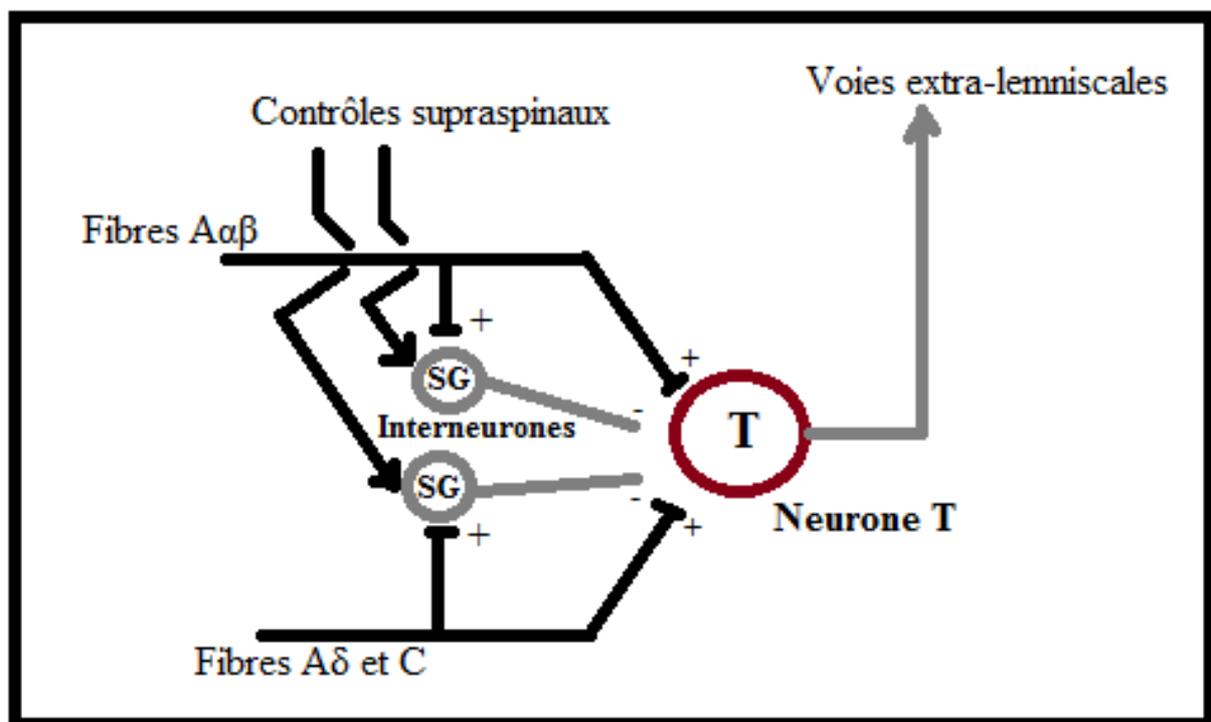


Figure 7 : contrôle segmentaire du « Gate control » (Théorie du portillon de Melzack et Wall).

Ce modèle repose sur l'équilibre d'une balance entre les deux types d'activités exercées sur les neurones nociceptifs non spécifiques médullaires. Les fibres nociceptives de petit diamètre A δ et C d'origine segmentaire périphérique sont activatrices alors que les fibres nociceptives de gros diamètre A α , β de même origine sont inhibitrices [Neugebauer, 2009].

I.5.3. A l'étage supra-médullaire.

❖ Les contrôles descendants [Neugebauer, 2009, Boger et al. 2013].

Le contrôle de la douleur s'exerce au niveau du tronc cérébral et probablement au niveau du thalamus, par des voies descendantes. La substance grise péri-aqueducale (SGPA), le noyau du raphé magnus (NRM), l'aire parabrachiale, le locus coeruleus et l'hypothalamus y sont impliqués. La sérotonine et la noradrénaline jouent un rôle prépondérant dans ces contrôles. Les endomorphines et d'autres peptides sont impliqués dans ces mécanismes.

La stimulation du Raphé Magnus du bulbe entraîne une diminution de la sensation douloureuse, c'est une voie sérotoninergique. Elle entraîne la sécrétion d'endomorphines par les inter-neurons de la corne dorsale, mais il semble que la sérotonine ait aussi une action directe à ce niveau.

La stimulation de la SGPA et du locus coeruleus diminue la sensation douloureuse. Ce sont des voies noradrénergiques.

❖ Les contrôles inhibiteurs diffus induits par la nociception (CIDN).

Les neurones de convergence peuvent être inhibés par un influx nerveux extérieur à leur champ par une boucle spino-bulbo-spinale passant par le noyau subréticulaire dorsalis (SRD). Ces CIDN semblent jouer le rôle de filtre des messages envoyés aux centres supérieurs pour repérer le caractère nociceptif de ce message.

❖ Les endomorphines.

La découverte des endomorphines a suscité beaucoup d'intérêt, mais il est encore impossible, à ce jour, d'expliquer les mécanismes par lesquels elles agissent au niveau de la nociception.

Un certain nombre de faits sont démontrés : leur forte concentration à tous les niveaux, périphérique, médullaire et supra médullaire ; l'inhibition de la sécrétion de substance P, neurotransmetteur de la douleur. La naloxone supprime l'action analgésique des stimulations centrales. Il existe trois familles d'endomorphines, les endorphines, les enképhalines et les dynorphines [Kim et al. 2013 ; Neugebauer, 2009].

II. LA DOULEUR CHRONIQUE.

La perception de la douleur peut varier, par modification du seuil douloureux ou par modification de l'intensité de la douleur ressentie pour un stimulus donné (Woolf et Mannion, 1999). L'allodynie correspond à une douleur ressentie pour un stimulus normalement senti comme non douloureux. L'hyperalgésie correspond à une réponse amplifiée, à une stimulation douloureuse, témoignant d'une augmentation de l'intensité de douleur ressentie. On distingue l'hyperalgésie primaire de l'hyperalgésie secondaire. L'hyperalgésie primaire correspond à une hyperalgésie localisée au site lésionnel. L'hyperalgésie secondaire correspond à une extension de l'hyperalgésie en périphérie du site lésionnel. Cette distinction prend son sens dans la mesure où l'hyperalgésie primaire et l'hyperalgésie secondaire impliquent des mécanismes différents : l'hyperalgésie primaire correspond surtout à une sensibilisation périphérique alors que l'hyperalgésie secondaire correspond surtout à une sensibilisation centrale [Campbell et Meyer, 2006].

II.1. Hyperalgésie primaire et sensibilisation périphérique

L'hyperalgésie primaire peut être mécanique et thermique (contrairement à l'hyperalgésie secondaire uniquement mécanique) [Treede et al., 1995]. Elle est le résultat d'une sensibilisation périphérique liée en grande partie à la libération locale de médiateurs de l'inflammation (prostaglandines, les leukotriènes, les cytokines, la substance P et le CGRP), dont l'effet est de réduire le seuil de recrutement des nocicepteurs ou encore de les activer directement. Ainsi des nocicepteurs A δ , normalement insensibles aux stimulations mécaniques [LaMotte, 1992] peuvent le devenir et être responsables d'une allodynie mécanique dans la zone lésée.

II.2. Hyperalgésie secondaire et sensibilisation centrale.

L'hyperalgésie secondaire se caractérise par un élargissement de la zone périphérique douloureuse autour de la lésion initiale, par une diminution du seuil nociceptif dans cette région et une augmentation de l'intensité douloureuse perçue pour un même stimulus. Elle dépend du phénomène de sensibilisation centrale, au cours duquel la transmission synaptique est modifiée ce qui implique entre autres les récepteurs NMDA [Woolf, 2000].

II.3. La douleur neuropathique.

II.3.1. Définition.

Selon la nouvelle définition de l'IASP, la douleur neuropathique est un type de douleur chronique causée par une lésion ou une maladie du système nerveux somatosensoriel. La lésion signifie que les dommages sont directement sur le système somatosensoriel, alors que la maladie se réfère à des blessures liées indirectement par le stress métabolique, les maladies auto-immunes ou inflammatoires et autres [Treede et al. 2008]. Les lésions peuvent avoir lieu non seulement au niveau des nerfs somatosensoriels, mais aussi au niveau des nerfs qui innervent les organes viscéraux. Ainsi, la douleur neuropathique est un traitement somatosensoriel aberrant qui contraste avec la plasticité normale du système somatosensoriel dans la douleur nociceptive [Xu et al. 2012]. Selon les sites de la lésion, la douleur neuropathique peut être divisée en douleur neuropathique centrale et en douleur neuropathique périphérique. La douleur neuropathique centrale est la douleur causée par une lésion ou une maladie du système nerveux central somatosensoriel; tandis que la douleur neuropathique périphérique est causée par une lésion ou une maladie du système nerveux somatosensoriel périphérique. Malgré les différents sites de lésions, les synapses sensorielles centrales sont impliquées dans les deux cas [Xu et al. 2012].

II.3.2. Etiologie centrale et Périphérique.

Les douleurs neuropathiques peuvent être classées en deux grands types : périphériques ou centraux selon la localisation de la lésion neurologique causale [Bouhassira et Attal, 2012]. Les premières sont caractérisées par l'existence d'une atteinte du système somato-sensoriel périphérique. Selon la topographie, la distribution lésionnelle peut concerner un plexus (arrachement du plexus brachial), une racine (radiculopathie post-sciatique ou zostérienne), un tronc nerveux (lésion du nerf cubital du coude) ou être plus diffuse (polyneuropathies). Les compressions radiculaires chroniques par hernie distale, les neuropathies périphériques liées à des troubles métaboliques (diabète, éthylysme), à une infection (VIH) ou à l'action neurotoxique iatrogène des anticancéreux ou des antiviraux.

Dans le cas des douleurs neuropathiques centrales, la lésion peut intéresser les voies sensitives intra-médullaires (les cornes dorsales, les cordons dorsaux ou plus souvent le faisceau spino-thalamique) ou les relais intracérébraux de la sensibilité (tronc cérébral, thalamus, cortex sensitif). Leur classification se base sur le territoire neurologique atteint.

A l'étage médullaire, en cas de traumatisme la douleur est ressentie de façon bilatérale soit au niveau lésionnel (douleurs suspendues) soit au niveau sous-lésionnel (douleurs segmentaires).

Dans le tronc cérébral, la pathologie douloureuse la plus fréquente est la conséquence du syndrome de Wallenberg qui est une atteinte ischémique intéressant le faisceau spino-thalamique au niveau bulbaire et qui souvent se traduit par une anesthésie thermo-algique controlatérale de la face.

Dans le thalamus, ce sont les séquelles d'accidents vasculaires localisés au noyau ventro-postéro-latéral (syndrome thalamique de Déjerine et Roussy) qui ont pour conséquence des douleurs intenses et une diminution de la sensibilité d'une moitié du corps.

Enfin, lorsque la lésion est encéphalique, le plus souvent les lésions sont observables à l'échelle d'un hémicorps [Cetas et al. 2008 ; Janig et al. 2002].

II.3.3. Mécanismes de base de la douleur neuropathique.

Grâce à l'utilisation de modèles animaux, diverses altérations moléculaires et cellulaires ont été identifiées en relation avec la douleur neuropathique chronique. A la périphérie, les lésions neuropathiques déclenchent la sensibilisation et peuvent induire une activité neuronale anormale à long terme le long des voies afférentes primaires [Basbaum et al. 2009] (voir Figure 8). Dans la moelle épinière, les neurones de la corne dorsale présentent des réponses excitatrices potentialisées et une diminution de seuil en réponse à la douleur neuropathique chronique [Hargreaves et al. 1988 ; Decoster et Woolf, 2000 ; Kohno et al. 2003].

Par exemple, la compression répétitive du nerf sciatique induit la potentialisation à long terme (LTP) au niveau des synapses des fibres C [Kohno et al. 2003], et l'activité de la moelle épinière sera potentialisée dans la douleur chronique, laquelle pourra

induire une entrée synaptique capable de conduire des potentiels d'action dans les neurones de la corne dorsale [Latremoliere et Woolf, 2009]. Néanmoins, les interventions pharmacologiques ciblant des altérations au niveau de la colonne vertébrale ne parviennent pas à supprimer adéquatement la douleur chronique, qui est souvent accompagnées par des effets secondaires indésirables, et de diminution de l'efficacité au fil du temps. Par conséquent, les enquêtes récentes ont porté sur les changements moléculaires dans les régions du cerveau qui peuvent médier la douleur neuropathique chronique. La plasticité synaptique dans les zones corticales clés impliquées dans la douleur a été observée en relation avec la douleur neuropathique chronique [Zhuo, 2008]. En particulier, les études fournissent des preuves constamment solides des variations de la transmission excitatrice dans des modèles animaux de douleur neuropathique. Dans le cortex cingulaire antérieur (CCA), par exemple, une région du cerveau impliquée dans la douleur critique affecte [Vogt, 2005], les cascades de signalisation intracellulaire activées par une lésion neuropathique périphérique ont été trouvées pour induire des changements moléculaires persistants qui potentialisent la transmission excitatrice glutamatergique [Xu et al. 2008, Wu et al. 2005 ; Zhao et al. 2006]. Par exemple, il a été montré pour induire la phosphorylation de canaux GluR1 AMPA post-synaptiques et améliorer les réponses médiées par GluR1 au sein du CCA de la souris après lésion nerveuse [Xu et al. 2008]. Il est intéressant que le calcium stimulé par l'adénylyl cyclase 1 (AC1) soit critique pour cet effet. En conséquence, la médiation de l'activité de la protéine kinase AC1 M- ζ (PKM ζ) n'a été trouvée pour maintenir la douleur neuropathique par des altérations induites au sein du CCA [Li et al. 2010]. Plus précisément, les enregistrements in vitro des tranches du CCA à révélé que ζ -pseudosubstrat peptide inhibiteur (ZIP) inhibe la PKM ζ pour empêcher la potentialisation synaptique induite par une lésion nerveuse, tandis que in vivo les injections intra-CCA ont considérablement réduit l'allodynie mécanique. Ces observations ont permis la découverte récente que l'inhibition spécifique d'AC1 réduit la douleur chronique chez les modèles de douleur neuropathique animaux [Wang et al. 2005]. D'autres régions du cerveau ont également été observés à subir des changements dans la transmission

excitatrice, y compris l'amygdale [Ren et Neugebauer, 2010], le cortex insulaire, et les cortex sensoriels primaires et secondaires (Figure 8) [Basbaum et al. 2009].

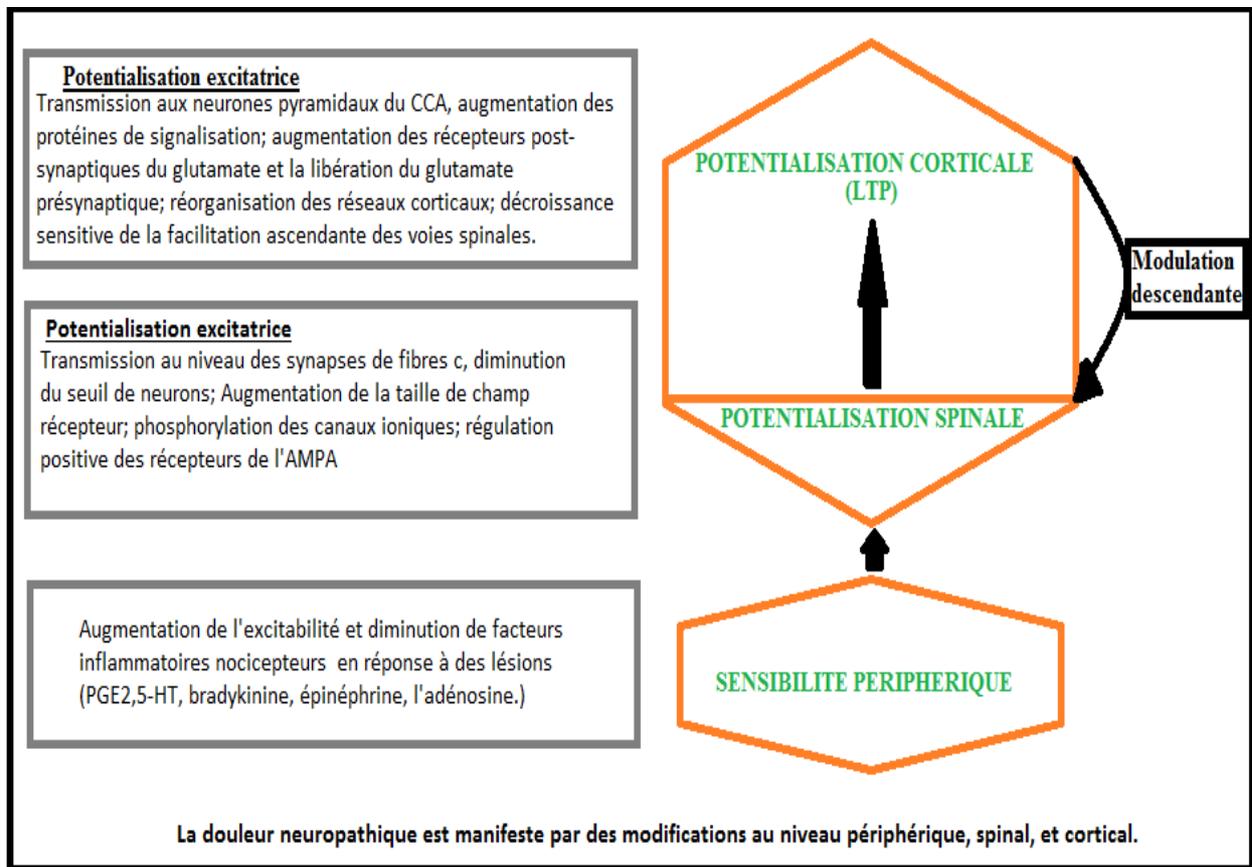


Figure 8 : Des modifications au niveau périphérique, spinal et cortical dans la douleur neuropathique.

A la périphérie, la douleur neuropathique est associée à des changements d'excitabilité des nocicepteurs. Au niveau de la moelle épinière, la potentialisation à long terme (LTP) de la transmission synaptique excitatrice sensorielle ont lieu au moins à des échelles de temps similaires. La régulation positive des récepteurs AMPA post-synaptiques y compris un éventuel recrutement de synapses silencieuses contribuent à la LTP de la moelle. Similaire à la LTP rapporté dans d'autres synapses centrales, différentes protéines kinases et une nouvelle synthèse des protéines sont également nécessaires. Dans le cortex, la douleur neuropathique est associée à l'induction de la LTP, y compris en phase tardive LTP (L-LTP) au niveau des synapses corticales. Les deux modifications présynaptiques et post-synaptiques observées résultent de l'activité excitatrice potentialisée en cours. Des-inhibition de la

modulation inhibitrice locale ont également été trouvée dans la corne dorsale de la moelle et les zones corticales. La modulation décroissante facilitatrice des zones corticales et sous-corticales contribuent également à la transmission sensorielle renforcée dans la moelle épinière de la corne dorsale [Xu et al. 2012].

II.4. La douleur neuropathique diabétique.

II.4.1. La physiopathologie.

La physiopathologie de la neuropathie diabétique implique à la fois des facteurs métaboliques et vasculaires. L'hyperglycémie est au centre de la pathogénèse.

❖ Augmentation de sorbitol et de fructose.

L'hyperglycémie entraîne une augmentation de l'activité de l'enzyme appelé aldose-réductase (1^{ère} étape dans la voie des polyols) qui conduit à l'accumulation de sorbitol et de fructose et une diminution de la myo-inositol libre dans le nerf. Il provoque également un déséquilibre dans le phosphate de nicotinamide adénine dinucléotide et sa forme réduite. Le NADPH est un cofacteur de l'enzyme synthase de l'oxyde nitrique qui réduit la formation de l'oxyde nitrique, qui est un vasodilatateur important. Tous ces facteurs conduisent à une insuffisance de l'approvisionnement en sang de nerfs [Cameron et Cotter, 1994].

❖ Produits avancés de glycation.

L'hyperglycémie conduit à l'incorporation de glucose dans les protéines non enzymatique par une glycation de la réaction non réglementée [Bhadada et al. 2001]. Les différentes protéines qui se glyquent comprennent l'hémoglobine, l'albumine du plasma, les lipoprotéines, la fibrine et le collagène. Tous ces produits finaux glyqués transversaux forment progressivement les produits protéiques fluorescents appelés produits finis de glycation. Ils sont à l'origine du dommage tissulaire en raison de leur réactivité sur les protéines.

❖ **Espèces réactives de l'oxygène.**

L'auto-oxydation du glucose en excès conduit à la formation d'espèces réactives de l'oxygène. Ces radicaux libres d'oxygène provoquent des dégâts sur les nerfs par un effet toxique direct ou par l'inhibition de la production d'oxyde nitrique par l'endothélium qui conduit à une ischémie des nerfs. Ainsi le stress oxydatif est également principalement impliqué dans la neuropathie.

❖ **Activation inappropriée de la protéine kinase C et autres.**

D'autres facteurs contribuant à la neuropathie sont une activation inappropriée de la protéine kinase C, une diminution du facteur de croissance des nerfs (responsable de la régénération des nerfs), tels que des anomalies biochimiques qui vont diminuer l'acide gamma-linolénique, qui est un précurseur de prostanoïdes incluant la prostacycline. La prostacycline est un puissant vasodilatateur, et sa réduction de la circulation sanguine conduit à une réduction du flux sanguin [Kaur et al. 2011].

II.4.2. Mécanisme de génération de la neuropathie diabétique douloureuse. (Figure 9)

II.4.2.1. Sensibilisation

Le mécanisme sous-jacent la génération de la douleur est une hyperexcitabilité dans les nocicepteurs afférents primaires (sensibilisation périphérique) qui consécutive aux dommages des nerfs périphériques. Ceci à son tour conduit à une hyperexcitabilité des neurones centraux (sensibilisation centrale) et la génération des impulsions à l'intérieur de l'axone spontané ainsi que le ganglion de la racine dorsale de ces nerfs périphériques. La sensibilisation se réfère à une diminution du seuil d'activation, l'augmentation de la réponse à un stimulus donné, et l'activité spontanée anormale. C'est un processus d'auto- résolution, sauf en cas de maladies chroniques telles que le diabète avec des dommages en cours, les symptômes spontanés continuent à être générés en raison d'une sensibilisation continue et les processus modifiés des nocicepteurs [Baron et al. 2000].

II.4.2.2. Système nerveux sympathique.

Le rôle de la douleur à médiation sympathique dans la PDN a été démontré dans différentes études. Dans l'une des études, les troubles de la vasoconstriction à médiation sympathique chez les patients souffrant de NDD a été démontré dans la régulation suggestive du débit sanguin local inapproprié chez ces patients [Scadding, 1981 ; Tsigos et al. 1993].

II.4.2.3. Rôle des canaux sodiques.

Au site de la lésion et le long de la longueur de l'axone, il se produit une accumulation des canaux sodiques. Ce phénomène conduit à une ectopiede décharge électrique et hyperexcitabilité conduisant à une hausse d'impulsions électriques à la corne dorsale, l'altération dans le mécanisme de déclenchement et l'expression de la substance P[Spruce et Coppini, 2003].

II.4.2.4. Potentialisation à long terme

L'excitation périphérique conduit à une excitation centrale, ce qui induit à l'activation de N-méthyl-D aspartate (NMDA) de la corne dorsale. L'activation des récepteurs de NMDA conduit à la libération de glutamate, ce qui provoque une potentialisation synaptique, qui est un potentiel post-synaptique plus connu sous le nom de potentialisation à long terme. Ce phénomène a été observé dans divers états de la douleur [Baron, 2000 ; Spruce et Coppini, 2003].

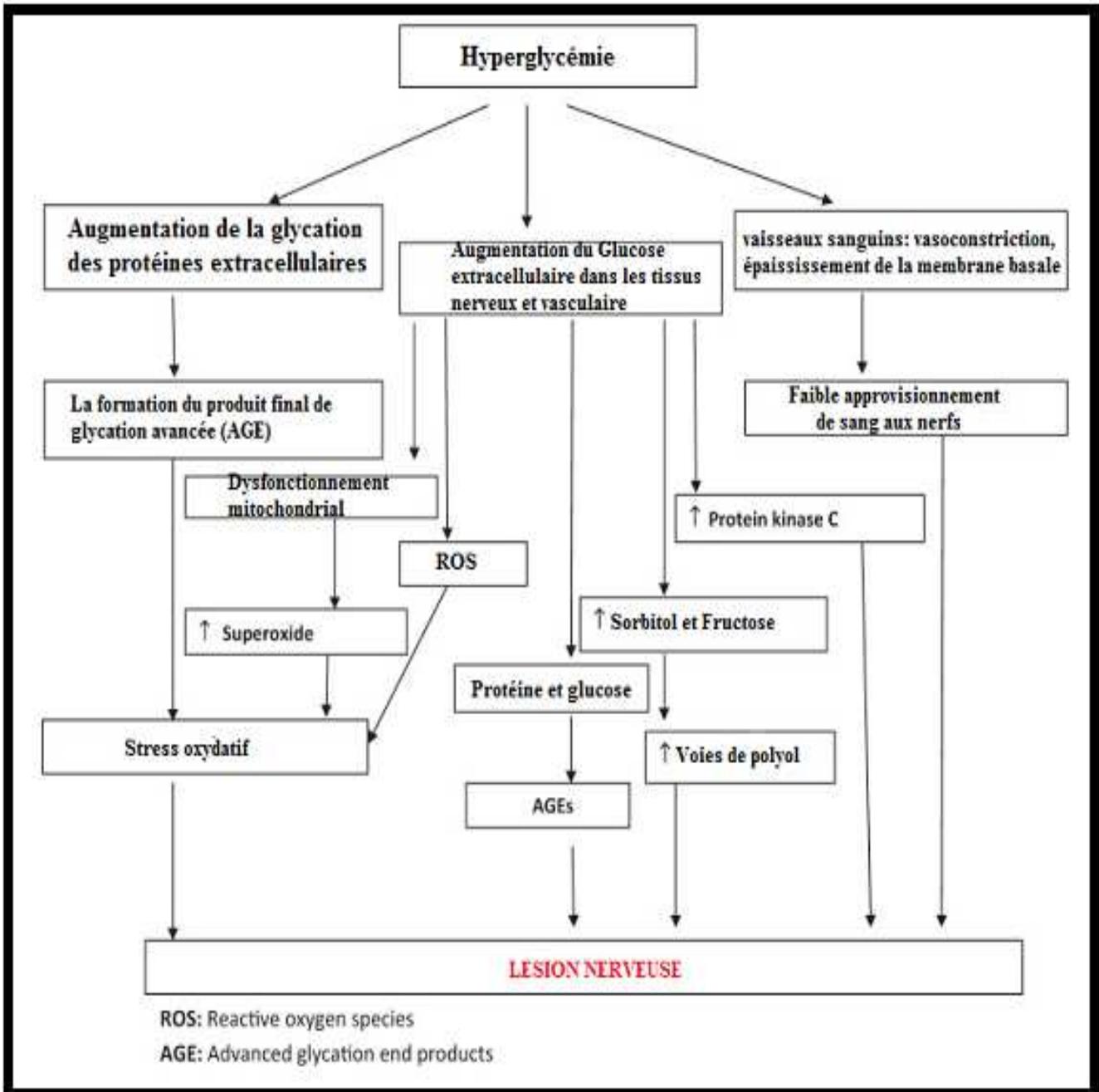


Figure 9 : Mécanisme de génération de la douleur neuropathique diabétique.

III. LES VOIES DE SIGNALISATION DANS LA DOULEUR CHRONIQUE.

III.1. La phosphorylation de MAPK.

La famille de MAPK comprend trois principaux membres: la Régulation du signal Extracellulaire de kinase 1 et 2 (respectivement ERK1 et ERK2), la p38 et le c-Jun N-terminal kinases (JNK)). L'ERK5 est un nouveau membre de la famille et a été

montrée pour être activé dans la microglie spinale après lésion du nerf [Obata et al. 2007]. Les voies de MAPK jouent un rôle important dans la signalisation intracellulaire dans les neurones et les cellules gliales, et les deux sont nécessaires pour la genèse de la douleur persistante [Obata et Noguchi, 2004 ; Ji et al. 2009]. Il est à noter que les différents MAPK présentent une activation distincte (de phosphorylation) dans les cellules gliales après des lésions douloureuses [Ji et al. 2009]. Les MAPKs sont activés par des médiateurs pro-inflammatoires [Ji et al. 2009] et inactivés par des phosphatases, comme la MAPK phosphatase (MKP1, 2, 3). De nombreuses études indiquent que l'activation de MAPK dans les cellules gliales de la corne dorsale de la moelle épinière est essentielle pour le développement de la douleur persistante [Ji et al. 2009].

III.2. Régulation des récepteurs, des canaux, et les transporteurs dans les cellules gliales.

De multiples récepteurs, des canaux et des transporteurs sont exprimés dans les cellules gliales et sont réglementés dans différents états de douleur. Bien que ces molécules ne sont pas sécrétés, ils jouent un rôle actif dans la signalisation intracellulaire des cellules gliales en activant les voies MAPK et induire la synthèse, la libération et l'absorption des molécules sécrétées. Plusieurs enzymes sont également activement impliqués dans la signalisation des cellules gliales dans la douleur. La Cyclooxygénase-1 et -2 (respectivement COX-1 et COX-2) est induite dans les astrocytes et les microglies après une lésion nerveuse et la douleur neuropathique [Eisenach et al. 2010].

III.3. Régulation de cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance, et des protéases dans la glie.

La glie produit à la fois de grandes molécules (cytokines, chimiokines, facteurs de croissance, et proteases) et les petites molécules (glutamate, ATP, D-sérine, prostaglandine E2 (PGE2)). Ces médiateurs gliaux peuvent moduler l'activité neuronale et synaptique et par conséquent la sensibilité à la douleur. Des cytokines pro-inflammatoires telles que les facteurs de TNF- α , d'IL-1 β et d'IL-6 sont des médiateurs gliaux les mieux étudiés. Leur augmentation a été observée dans la lésion

de la moelle épinière, l'inflammation, le cancer des os, et lors de l'exposition chronique aux opioïdes, et ils contribuent à l'élaboration et l'entretien de l'inflammatoire, de la douleur neuropathique. [Watkins et al. 2007 ; Wei et al. 2008]. Leur maturation exige souvent l'intervention de la caspase-1 et des inflammasomes [Berta et al. 2012].

III.4. Interactions neurones-Cellules gliales et cellules gliales- gliales dans la douleur chronique.

Chacun de nos organes fonctionne grâce à la communication entre les cellules qui le composent. Les neurones, cellules clés du cerveau, utilisent un mode de communication très sophistiqué *via* des structures spécialisées, les synapses chimiques. Ces synapses permettent la transmission de l'information nerveuse en convertissant le signal électrique qui se propage le long de l'axone en signal chimique, via l'émission de neurotransmetteurs, par le neurone présynaptique, dans la fente synaptique. Ces neurotransmetteurs vont activer le neurone postsynaptique, transmettant ainsi l'information. La libération des neurotransmetteurs s'effectue par un mécanisme d'exocytose. Au cours de ce processus, une augmentation transitoire de calcium dans le neurone présynaptique provoque la fusion de vésicules contenant le neurotransmetteur avec la membrane plasmique *via* le complexe protéique SNARE, complexe hautement sensible à la toxine botulique. Outre les neurones, la glie remplit l'espace interneuronal et fournit un support structurel et métabolique aux neurones [Kettenmann et Ransom, 2004]. Les différents types cellulaires, dont les astrocytes, la glie de Bergmann dans le cervelet et les cellules de Müller dans la rétine, enrobent les synapses du système nerveux central. Plusieurs résultats expérimentaux indiquent que les cellules gliales détectent l'activité synaptique et régulent la transmission synaptique *via* la libération de gliotransmetteurs (notamment le glutamate, un transmetteur excitateur) selon un mécanisme encore inconnu. La libération de ces gliotransmetteurs reposerait sur un mécanisme d'exocytose induite par le calcium, similaire à celui qu'utilisent les neurones pour la libération des neurotransmetteurs au niveau de la synapse (Figure 10) [Gao et Ji, 2010].

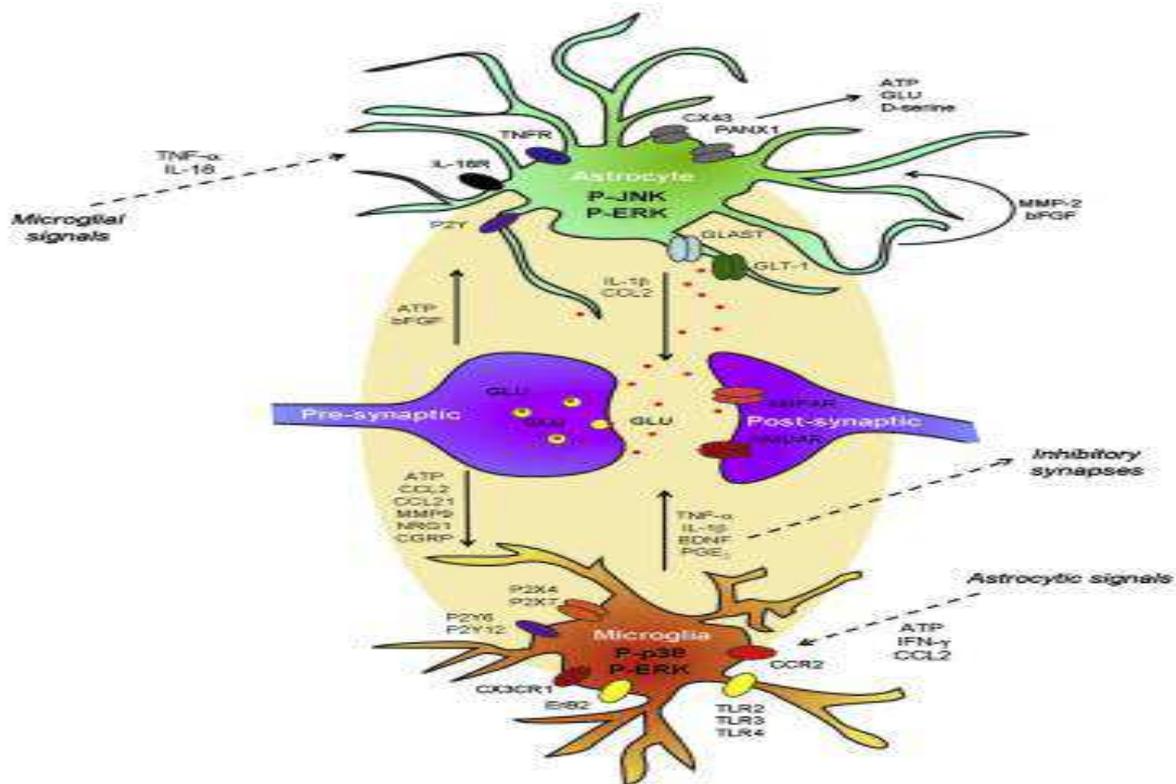


Figure 10 : Schéma des interactions neurones-Cellules gliales et Cellules gliales-gliales dans la moelle épinière.

La décharge spontanée après une lésion douloureuse se traduit par la libération de l'ATP, les chimiokines (CCL2, CCL21, CX3CL1), MMP-9, NRG1, et CRGP des afférences primaires terminales centrales, conduisant à l'activation de la microglie dans la corne dorsale. La microglie de la moelle épinière exprime les récepteurs de l'ATP (P2X4, P2X7, P2Y6, P2Y12) et les chimiokines (CX3CR1, CCR2) et NRG1 (ErbB2). L'activation de ces récepteurs induit la phosphorylation de p38 et ERK (phase précoce) dans la microglie, conduisant à la production et la libération des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-18), le facteur de croissance BDNF, et la sensibilisation consécutive des neurones de la corne dorsale. Les astrocytes peuvent être activées par des médiateurs microgliaux (TNF- α et IL-18), ainsi que les médiateurs astrocytaires (matrice métalloprotéine-2 (MMP-2) et bFGF). La phosphorylation de JNK et ERK-P dans les astrocytes a pour résultat la production et la libération de chimiokines (par exemple CCL2) et des cytokines (par exemple, l'interleukine-1 β [IL-1 β]). Les astrocytes produisent également l'adénosine triphosphate (ATP) et le glutamate après l'activation des hémicanaux (Cx43 et PNX1). Après une lésion nerveuse, la régulation négative des résultats de GLT1 astrocytaires

entraîne une diminution de l'absorption astrocytaire de glutamate. La libération de médiateurs astrocytaires (CCL2, l'interleukine-1 β [IL-1 β], glutamate) peut provoquer une sensibilisation centrale de la médiation NMDAR. La Libération de l'adénosine triphosphate (ATP) et des astrocytes CCL2 peut en outre maintenir l'activation de la microglie [Gao et Ji, 2010].

IV. LE TRAITEMENT DE LA DOULEUR NEUROPATHIQUE.

Les options de traitement de la douleur neuropathique sont caractérisées par une efficacité limitée et une fenêtre thérapeutique étroite [Haslam et Nurmikko, 2008; Perkins et Dray, 1996]. Il est également difficile de prédire la réponse au traitement de chaque patient.

IV.1. Traitement médicamenteux.

La pharmacothérapie fournit un soulagement de la douleur cliniquement significative de 40 à 60% des patients souffrant de douleur neuropathique. La douleur neuropathique associée par exemple au virus de l'immunodéficience humaine (VIH), répond à très peu d'interventions (Phillips et al., 2010). En outre, le soulagement de la douleur est presque partiel plutôt que total (environ 30% plus grande que le placebo) et est associée à de nombreux effets secondaires, notamment la toxicité cardiaque, des nausées, la sédation et la dépendance physique [Borsook et Becerra, 2006].

De plus en plus la douleur chronique sévère est traitée selon l'escalade de l'Organisation mondiale de la Santé pour le traitement de la douleur cancéreuse. La sélection des analgésiques les plus puissants allant de non-opioïdes (par exemple les AINS classiques non-sélective d'inhibiteurs de Cox, les sélectifs de l'inhibition de Cox-2, le paracétamol, le metamizol), les opioïdes faibles (par exemple, la codéine, la dihydrocodéine, le tramadol, la tilidine) aux opioïdes très puissants (par exemple la morphine, le fentanyl, la buprénorphine). Les opiacés cliniquement disponibles est le récepteur de μ -opioïdes; cependant, ils se lient aussi à d'autres récepteurs opioïdes, avec une affinité de liaison relativement faible [Callo et al., 2000], avec quelques exceptions, c'est le cas des κ -agonistes opioïdes (par exemple la pentazocine, la

nalbuphine, le butorphanol, le levallorphan et la norbinaltorphine). D'autres analgésiques classiques comprennent la flupirtine, un activateur de la protéine G couplé aux canaux K^+ , les cannabinoïdes, qui activent les cannabinoïdes CB1 et CB2 et sont reconnus pour le traitement de la douleur neuropathique, et certains antagonistes des canaux ioniques NMDA tels que la kétamine [Nagy, 2000]. Les co-analgésiques sont principalement utilisés pour des indications cliniques autres que le soulagement de la douleur, cependant ils ont démontré des effets analgésiques dans des conditions particulières de la douleur comme la douleur neuropathique. Les médicaments anti-épileptiques tels que la prégabaline et de la gabapentine, qui modulent la sous-unité $\alpha 2\delta$ des canaux calciques voltage-dépendants de type L (Field et al., 2006); la carbamazépine et la lamotrigine, modulent respectivement les canaux de sodium sous-unités de voltage-dépendants Nav1.5 et Nav1.2 ; et les antidépresseurs tricycliques ou hétérocycliques qui augmentent la signalisation neuronale noradrénergique et 5 hydroxytryptaminergique en inhibant ainsi les canaux sodiques. La reconnaissance de la douleur chronique comme un problème de santé publique majeur a déclenché le développement de nouveaux analgésiques. Plusieurs nouvelles substances en cours d'approbation, comme les inhibiteurs des canaux calciques voltage-dépendants, ou en cours d'essais cliniques. Plusieurs nouvelles cibles médicamenteuses analgésiques ont été révélées, tels que les canaux sodiques, les canaux calciques et les cellules gliales [Edwards et al. 2008 ; Javed et al. 2015].

IV.2. Le traitement non médicamenteux. [Smith et al. 2012 ; Kim et al. 2013].

De nombreux traitement non médicamenteux existent pour traiter la douleur neuropathique et sont toujours mis en œuvre parallèlement au traitement médicamenteux. Ils sont de 3 types : les traitements physiques, les traitements chirurgicaux, les traitements psychocorporels et psychothérapeutiques.

❖ La neurostimulation transcutanée

Elle est un traitement physique simple renforçant les contrôles inhibiteurs locaux, indiqué dans la douleur neuropathique focale lorsqu'un tronc nerveux sensitif de localisation superficielle peut être stimulé en amont.

❖ **La chirurgie destructrice**

Elle est représentée aujourd'hui par la drezotomie, destruction des fibres nociceptives et de leur zone d'entrée dans la moelle, indiquée essentiellement dans la douleur d'avulsion plexique.

❖ **La chirurgie fonctionnelle**

Elle est la stimulation électrique implantée, médullaire ou centrale (encéphalique), des structures exerçant un contrôle inhibiteur sur les voies de la douleur.

❖ **La stimulation médullaire**

Elle s'effectue au niveau des cordons postérieurs de la moelle, et est indiquée essentiellement dans les mononeuropathies segmentaires rebelles au traitement médicamenteux.

❖ **La stimulation centrale**

Elle s'effectue au niveau du cortex moteur, et est indiquée dans les douleurs centrales rebelles.

❖ **Les techniques psychocorporelles**

(Relaxation, sophrologie, hypnothérapie) sont utiles pour réduire l'anxiété et l'hypertonie neurovégétative, facteurs d'aggravation de la douleur neuropathique.

IV.3. Le traitement alternatif de la douleur neuropathique : la phytothérapie.

Il ya plus de 7000 ans, les diverses formes de produits naturels ont été utilisés pour traiter les troubles de la douleur. Les exemples prototypiques de ces produits naturels sont le pavot à opium (*Papaver soniferum*) et l'écorce de l'arbre de saule (*Salix spp.*). C'est au 19e siècle que la composition chimique de ces plantes a été déterminée. Les sources connues de ces substances ont été examinées minutieusement [Kennedy et al. 2013]. Au cours des dernières décennies, plusieurs substances analgésiques ont été purifiées à partir de produits naturels issus de nouvelles classes et les mécanismes d'actions ont été déterminés. Les plantes et les autres produits naturels décrits dans la littérature historique ethnobotanique et ethnopharmacologique sont devenus d'intérêt dans les efforts de découverte de médicaments. Les manuscrits et les rapports sont

utilisés pour aider à l'identification des produits naturels qui ont été historiquement employés dans le soulagement de la douleur. Un facteur important qui a souligné l'importance de la découverte de nouveaux composés pour traiter la douleur a été dans la compréhension fondamentale des mécanismes complexes de la transmission de la douleur dans le système nerveux central. Le traitement nociceptif implique de nombreuses classes de récepteurs, des enzymes et des voies de signalisation. L'identification de nouvelles classes de composées naturelles peut conduire à une meilleure compréhension de ces mécanismes pharmacologiques (pas d'effets secondaires, pas de potentiel de dépendance). Les produits naturels constituent à l'avenir une opportunité de découverte de médicaments en particulier dans le traitement de la douleur [Brune, 2002 ; McCurdy et Scully, 2005].

Certaines herbes sont utilisées pour aider à la régénération des cellules et pour leur activité antioxydante et anti-inflammatoire dans le système nerveux central dans des modèles humains et animaux. D'autres plantes, ont montré une action anti-allodynique et hyperalgésique suggérant ainsi une inhibition centrale. Cependant, un petit nombre d'entre eux ont été étudié pour évaluer leur efficacité [Watcho et al. 2010 ; Shibata et al. 2011].

V. LES MODÈLES ANIMAUX DE DOULEUR NEUROPATHIQUE.

Les études expérimentales effectuées chez l'animal ont concerné principalement l'étude de la nociception. L'enjeu de la recherche fondamentale dans le domaine de l'étude de la douleur chronique a été d'établir de nouveaux modèles expérimentaux chez l'animal pour mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent ces douleurs. Les nouveaux modèles se sont développés en recherchant des analogies avec ce qui est décrit en clinique. Le but principal de l'étude de ces modèles en recherche fondamentale est d'acquérir des connaissances qui pourront ensuite être utilisées pour le traitement des douleurs chroniques chez l'homme. De telles études réalisées chez l'animal, en particulier pour les modèles de douleur chronique, sont limitées par des règles éthiques provenant des recommandations publiées par l'IASP et des directives des comités d'Éthique nationaux. Le chercheur doit épargner à l'animal toute

souffrance inutile et mettre en œuvre les méthodes permettant de limiter les douleurs quand elles sont inévitables. Ces principes s'appliquent à la fois aux modèles animaux de douleur aiguë et de douleur chronique. À ce titre, les chercheurs travaillant dans le domaine de la douleur, fédérés au sein de l'IASP, ont créé des guides standards éthiques dès 1980. Une réglementation relative à la protection des animaux d'expérience est aujourd'hui disponible [Ziermann, 1983]. Deux types de modèles sont principalement utilisés pour étudier la douleur neuropathique : les modèles lésionnels et les modèles chimiotoxiques [Höke, 2012 ; Islam, 2013].

V.1. Les modèles lésionnels.

Les modèles des sections de nerfs sciatiques ou des racines dorsales des nerfs cervico-thoraciques ont été utilisés chez le rat dans le but d'introduire des symptômes pouvant être proches de ceux observés chez l'homme à la suite de déafférentation ou de névrome. Plusieurs semaines après ce type de lésion, le rat présente des signes d'automutilation par autophagie progressive des doigts de la patte déafférentée. Un tel résultat est difficilement acceptable du point de vue éthique et ces modèles ne sont plus utilisés.

D'autres modèles se sont alors développés mettant en jeu des lésions du tronc nerveux moins massives. C'est ainsi qu'ont été décrits des modèles de lésions partielles de nerfs chez le rat et la souris, préservant en partie l'innervation sensorielle et motrice du membre lésé, à l'origine de manifestations comportementales évoquant des douleurs neuropathiques. L'un des premiers modèles validés a été celui de Bennett et Xie, basé sur la pose de ligatures partielles lâches le long du tronc commun du nerf sciatique (CCI).

Les animaux présentent alors des modifications comportementales comme une hyperalgésie mécanique et thermique au chaud par exemple [Bennett et Xie, 1988].

En s'inspirant de cette procédure, d'autres modèles ont été mis en place : une ligature serrée d'une partie (entre un tiers et la moitié) du tronc commun du nerf sciatique, modèle de « Seltzer » (PSNI) (Seltzer et al., 1990) ; ou une ligature serrée ipsilatérale des racines dorsales L5 et L6. Ces deux modèles reproduisent également des symptômes de douleurs neuropathiques du même type que ceux qui ont été décrits

avec le modèle de « Bennett et Xie » mais avec des caractéristiques différentes. [Bennett et Xie, 1988]

On peut également citer le modèle de la ligature du nerf infra orbitaire. Ce modèle est basé sur une constriction du nerf et a été caractérisé pour la première fois par Vos et collaborateurs [Vos et al., 1994]. Les rats présentent alors des modifications comportementales persistantes dans le temps. Pendant les deux premières semaines postopératoires, les rats présentent une augmentation de l'activité de toilettage du côté lésé tandis que la réactivité à la stimulation de cette région diminue. A partir de la troisième semaine postopératoire, les rats présentent une augmentation limitée des réponses à la stimulation sur le territoire de la ligature mais une augmentation très importante dans les aires entourant ce territoire [Vos et al., 1994].

Tableau III : comparatif des différentes composantes des modèles lésionnels.

Modèle	Spontané	Hyperalgésie mécanique	Allodynie mécanique	Latéralité
CCI (1988)	+	+	+	Uni
PSNI (1990)	+	+	+	Bi
SNL (1992)	+	?	+	Bi

L'ensemble de ces modèles ont entraîné de nombreuses controverses notamment sur la non reproductibilité des expériences de ligature lâche ou partielle des nerfs. Le modèle de Kim et Chung présente la plus grande reproductibilité puisqu'on réalise une ligature serrée des nerfs malheureusement ce modèle produit une composante inflammatoire importante résultante des lésions générées. Enfin ce dernier modèle présente le désavantage de nécessiter une chirurgie lourde.

V.2. Les modèles chimiotoxiques.

Le modèle de diabète expérimental à la streptozotocine chez le rat comme modèle de douleur chronique a été validé en 1986 par Forman et collaborateur [Forman et al., 1986] qui ont mis en évidence une diminution des seuils de réponse à la plaque chaude chez des rats diabétiques (STZ). Le modèle a été caractérisé par Courteix et

collaborateur [Courteix et al., 1993]. Les rats, rendus diabétiques par injection de streptozocine par voie intra-péritonéale, présentent des signes caractéristiques des douleurs neuropathiques deux semaines après induction du diabète. Les expérimentateurs ont observés des modifications des réactions des animaux à des stimulations nociceptives et non-nociceptives pouvant correspondre à l'apparition d'une hyperalgésie et d'une allodynie. Ce modèle a été controversé du fait de l'état de santé général détérioré des animaux (réduction du poids corporel, polyurie, diarrhée, vessie distendue). Il a été montré qu'un traitement chronique à l'insuline, à une dose ajustée pour rétablir une normo-glycémie, permet d'améliorer l'état général des rats [Courteix et al., 1993]

Un autre modèle physiopathologique a été décrit comme modèle de douleur neuropathique induit par un traitement rétroviral utilisé dans le traitement du VIH chez l'homme. Dans ce modèle les rats sont traités par la molécule de synthèse 2',3'-dideoxycytidine (ddc) qui est un analogue nucléosidique inhibiteur de la transcriptase inverse virale. Les animaux traités présentent des modifications comportementales caractéristiques des douleurs neuropathiques comme l'apparition d'une Allodynie et d'une hyperalgésie mécanique ou encore une allodynie thermique au froid [Van Steenwinckel et al., 2008]. Un modèle de douleur neuropathique induit par le cancer des os a été développé chez les souris en 1999 [Schwei et al., 1999]. Ce modèle est induit par injection de cellules de sarcome ostéolytique dans l'espace médullaire du fémur de la souris. Les expérimentateurs ont observé que la palpation du genou, qui est un stimulus non nociceptif chez l'animal contrôle, induisait un comportement nociceptif positivement corrélé avec l'extension des destructions osseuses. Ce modèle a été récemment adapté chez le rat par injection intra-tibiale de cellules de carcinome de glande mammaire de rat [Medhurst et al., 2002]. Les animaux traités présentent une allodynie mécanique. Ce modèle a l'avantage d'utiliser une procédure chirurgicale utilisée pour l'inoculation des cellules cancéreuses beaucoup moins invasive que celle utilisée dans le modèle souris (injection nécessitant une chirurgie intra-articulaire) qui de fait n'interfère pas avec le comportement nociceptif de l'animal. Enfin un modèle de sclérose en plaque chez le petit animal a été développé. En effet, expérimentalement, on peut produire des leuco-encéphalo-myélites par injection à

certaines souches de souris avec un adjuvant de Freund et un extrait de myéline (ou de protéine basique de la myéline, ou de certains peptides de cette protéine) ; c'est le modèle de l'Encéphalite dite allergique expérimentale (EAE).

Les derniers modèles expérimentaux décrits sont les modèles de douleurs neuropathiques induits par des traitements anticancéreux à base d'antimitotiques. Ces traitements anticancéreux induisent des neuropathies périphériques à l'origine de douleurs chroniques par leur action neurotoxique sur les fibres sensorielles périphériques. Ces modèles animaux, en comparaison avec les modèles lésionnels, présentent l'avantage de se rapprocher un peu plus de la clinique. En effet ces modèles reproduisent également les symptômes de douleurs neuropathiques observés chez l'homme, tout en gardant l'avantage d'être peu invasifs pour l'animal et de s'affranchir des réactions secondaires survenant à la suite des interventions chirurgicales. Les agents anticancéreux sont prescrits au cours de chimiothérapies faisant ainsi partie des méthodes de lutte anticancéreuse, au même titre que la chirurgie et la radiothérapie. Il s'agit d'un traitement systémique, diffusant dans tout l'organisme, qui a pour objectif de détruire les cellules malignes issues de la tumeur d'origine. Ces substances chimiques agissent sur la division des cellules, entraînant leur mort, mais leur cytotoxicité permet de s'attaquer à toutes les cellules de l'organisme en cours de division et provoque donc de nombreux effets secondaires au traitement.

VI. LES CELLULES GLIALES.

Les cellules gliales décrites par Rudolf Virchow comme un tissu conjonctif qui lie l'ensemble des éléments nerveux (Virchow, 1858). Peu après, en 1870, la nature cellulaire des cellules gliales ou la « glie » ou les cellules de la névroglie a été bien établie par Camillo Golgi. C'est vers la fin du 19^e siècle que vont commencer à être décrites les fonctions des cellules gliales dans le cerveau [Parpura et al. 2012]. En effet, les cellules gliales jouent un rôle primordial dans les mécanismes physiologiques et physiopathologiques du fonctionnement du système nerveux central. Elles sont constituées par les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules microgliales et des cellules épendymaires ou épendymocytes.

VI.1. Les Astrocytes.

V.1.1. Définition

Le nom « astrocytes » (Astron signifie une étoile, tandis que cytos désigne un récipient creux, et plus tard une cellule. Ainsi, l'Astrocyte désigne une cellule étoilée) a été découverte par Michael Von Lenhossék en 1891. Les astrocytes sont sans doute les cellules gliales les plus abondantes et se présentent sous plusieurs formes dans le système nerveux central (SNC). Cependant, il n'y a pas de définition claire de ce qu'est la cellule astrogliale. Généralement, les astrocytes sont des cellules étoilées qui pourraient être différenciées par l'expression de la GFAP, mais cette expression ne reflète pas la réalité. Des nombreux astrocytes dans le cerveau sain n'expriment pas la GFAP, seulement quelques-uns d'entre eux ont une morphologie semblable à une étoile. Les astrocytes sont très variables dans leur morphologie et leur fonction, et ces cellules dans diverses régions du cerveau peuvent avoir différentes propriétés physiologiques. Le nom « astrocytes » est donc utilisé comme un terme générique qui pourrait être appliqué à toutes les cellules du cerveau qui ne sont pas les neurones, les oligodendrocytes, les cellules microgliales ou les épendymocytes. Toutes ces cellules, qui relèvent de la définition ci-dessus, ont cependant une chose en commun: elles sont unies par leur fonction principale qui est la préservation de l'hémostase cérébrale. Par conséquent, les astrocytes peuvent être largement définis comme des «cellules gliales homéostatiques » critiques pour les fonctions du système nerveux central [Parpura et Verkhratsky, 2012].

VI.1.2. Les principaux rôles physiologiques.

❖ Etablissement de l'architecture cérébrale au cours du développement.

Lors du développement du SNC, des cellules gliales étendent des prolongements cytoplasmiques entre la zone germinale et la surface du tube neural, constituant ainsi des guides qui serviront à conduire la migration ultérieure des autres cellules (cellules gliales radiaires). Les astrocytes embryonnaires de la glie radiaire servent de « rails » lors de la migration des neurones immatures de l'espace périventriculaire vers les couches externes du cortex cérébral. L'astrocyte est également nécessaire à la

formation de la barrière hémato-encéphalique. De plus, les astrocytes sont responsables de la formation massive des synapses après la naissance.

❖ **Supports métaboliques pour les neurones** [Tsacopoulos et al., 1988].

Les neurones, étant étroitement entourés par des astrocytes, sont séparés des capillaires sanguins, source de glucose. Par conséquent, le glucose est transporté à partir des capillaires sanguins et métabolisé essentiellement dans les astrocytes. Le glucose est ensuite transformé en lactate puis libéré par les astrocytes dans le milieu extracellulaire. Le lactate est ensuite capté par les neurones qui vont le transformer en pyruvate par la lactate déshydrogénase. Le pyruvate entre alors dans le cycle de Krebs mitochondrial. Ce cycle assure la production des équivalents rédox (NADH) qui alimentent la chaîne respiratoire pour la production d'ATP, mais aussi des acides aminés comme le glutamate, principal neurotransmetteur exciteur dans le SNC. Les neurones sont également capables de capter le glucose et de le métaboliser, mais le substrat préféré pour le cycle des acides tricarboxyliques neuronaux est le lactate. Le glucose prélevé par les neurones est utilisé par d'autres voies métaboliques comme la glycolyse ou le cycle des pentoses phosphates.

Dans les synapses glutamatergiques, la libération présynaptique de glutamate entraîne une dépolarisation des neurones post-synaptiques par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques. L'action du glutamate est terminée par un captage du glutamate essentiellement astrocytaire. Le glutamate est cotransporté avec des ions sodiques, qui vont activer l'ATPase Na^+/K^+ , qui entraîne la stimulation de la glycolyse et la production de lactate, qui sera ensuite libéré puis capté par les neurones. Dans le cerveau, le glycogène est presque exclusivement stocké dans les astrocytes et la glycogénolyse est régulée par l'activité synaptique et par certains neurotransmetteurs : les monoamines (noradrénaline, sérotonine et histamine) ainsi que le VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) et l'adénosine.

❖ **Régulation de la formation de synapses dans le cerveau.**

Les synapses ne peuvent pas se développer correctement sans astrocytes. En effet, les astrocytes régulent la formation, la maturation et la maintenance des synapses. La vie d'une nouvelle connexion synaptique peut être divisée en trois phases importantes. La première phase constitue l'établissement d'un premier contact physique entre deux partenaires neuronaux, la seconde constitue le processus de maturation pendant laquelle chaque connexion acquiert ses propres caractéristiques et la dernière est une phase de stabilisation ou d'élimination de la connexion synaptique. Seuls les contacts les plus robustes sont conservés. Plusieurs études ont montré que les astrocytes induisent une augmentation de la formation de synapse [Pfrieger, 2009]. Les astrocytes régulent également la maturation pré- et post-synaptique, telles la densité en récepteurs et l'efficacité de libération des transmetteurs. Ceci se fait par l'intermédiaire de divers transmetteurs libérés par les astrocytes.

❖ **Modulation de la transmission synaptique**

Le fonctionnement du cerveau repose sur la transmission d'information de neurone en neurone, à travers une structure spécialisée, la synapse. Très simplement : l'information se propage sous la forme d'un signal électrique, le potentiel d'action, le long de l'axone neuronal. Lorsque le potentiel d'action arrive au niveau de la terminaison synaptique (élément présynaptique), ce signal électrique est converti en un signal chimique. Les neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique activent par la suite des récepteurs présents sur l'élément postsynaptique, et l'information est transmise.

Il a longtemps été considéré que la transmission synaptique était uniquement une histoire de neurone. Cependant, en 1999, la synapse s'est complexifiée avec l'émergence du concept de la synapse tripartite qui considère les astrocytes comme des éléments fonctionnels des synapses [Araque et al. 1999]. Au cours de ces vingt dernières années, de nombreux travaux réalisés dans plusieurs régions du cerveau ont révélé que les astrocytes étaient capables de détecter les transmetteurs libérés dans la fente synaptique, et de répondre [Perea et al. 2009 ; Halassa et al. 2010 ; Tasker et al. 2012].

Les astrocytes appartiennent au groupe des cellules gliales qui, contrairement aux neurones, n'émettent pas de potentiel d'action. Parmi leurs nombreux rôles, les astrocytes régulent l'efficacité du transfert d'information en libérant par exemple des transmetteurs, appelés gliotransmetteurs (comme le glutamate, la D-sérine ou encore les purines) [Volterra et al. 2012 ; Parpura et al. 2012]. Pour ce faire, au cours d'une activité synaptique intense qui recrute un réseau de neurones, les astrocytes détectent les neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique *via* des récepteurs exprimés à leur surface. L'activation de ces récepteurs provoque une augmentation de calcium dans les astrocytes. En retour, ces cellules gliales libèrent des gliotransmetteurs qui se lieront à des récepteurs soit neuronaux présynaptiques, soit neuronaux postsynaptiques, afin de réguler l'efficacité du transfert d'information [Perea et al. 2009 ; Halassa et al. 2010].

En accord avec la vision classique, les astrocytes détectent les transmetteurs libérés dans la fente synaptique en réponse à l'arrivée de plusieurs potentiels d'actions dans l'élément présynaptique. Cependant, en plus des activités synaptiques intenses faisant intervenir des réseaux synaptiques, la communication neuronale a aussi lieu au niveau de synapses individuelles, à des fréquences beaucoup plus faibles. Cette forme de communication détermine le tonus synaptique des neurones et façonne les mécanismes de plasticité synaptique qui sous-tendent diverses formes d'apprentissage. Afin de mieux comprendre comment l'information excitatrice glutamatergique est transmise dans le cerveau, nous avons voulu savoir si les astrocytes étaient également capables de détecter et de réguler la libération d'une seule vésicule de neurotransmetteurs (glutamate, neurotransmetteur excitateur) à la suite de l'arrivée présumée d'un seul potentiel d'action dans l'élément présynaptique [Panatier et al. 2011]. Cette transmission, appelée transmission synaptique de base, est fondamentale pour le fonctionnement du cerveau.

Les astrocytes sont caractérisés par la présence d'un prolongement principal et de nombreux prolongements qui leur confèrent une morphologie en forme « d'éponge ». Ces prolongements astrocytaires ne sont pas rectilignes. En effet, leur diamètre s'élargit le long de l'axe principal, puis s'affine à nouveau, délimitant des compartiments morphologiques (taille d'un compartiment mesurée le long de l'axe

principal du prolongement : environ 1 μm). Tout d'abord, il a été mis en évidence que les compartiments sont fonctionnels : ils interagissent avec les synapses et expriment à leur surface des récepteurs glutamatergiques.

Au cours de la transmission synaptique de base, l'astrocyte détecte les molécules de glutamate libérées dans la fente synaptique *via* des récepteurs métabotropiques du glutamate de type 5 (mGluR5, Figure 11). L'activation de ces récepteurs conduit à une augmentation de calcium dans le compartiment astrocytaire. En retour, l'astrocyte libère des purines *via* un mécanisme mettant en jeu les protéines de type SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*), sensibles à la toxine tétanique. Une fois libérées dans la fente synaptique, les purines activent des récepteurs à l'adénosine de type A_{2A} ($A_{2A}R$) présents sur la surface de l'élément neuronal présynaptique. L'activation de ces récepteurs conduit alors à une facilitation de la transmission synaptique de base au niveau de la synapse (Figure 11).

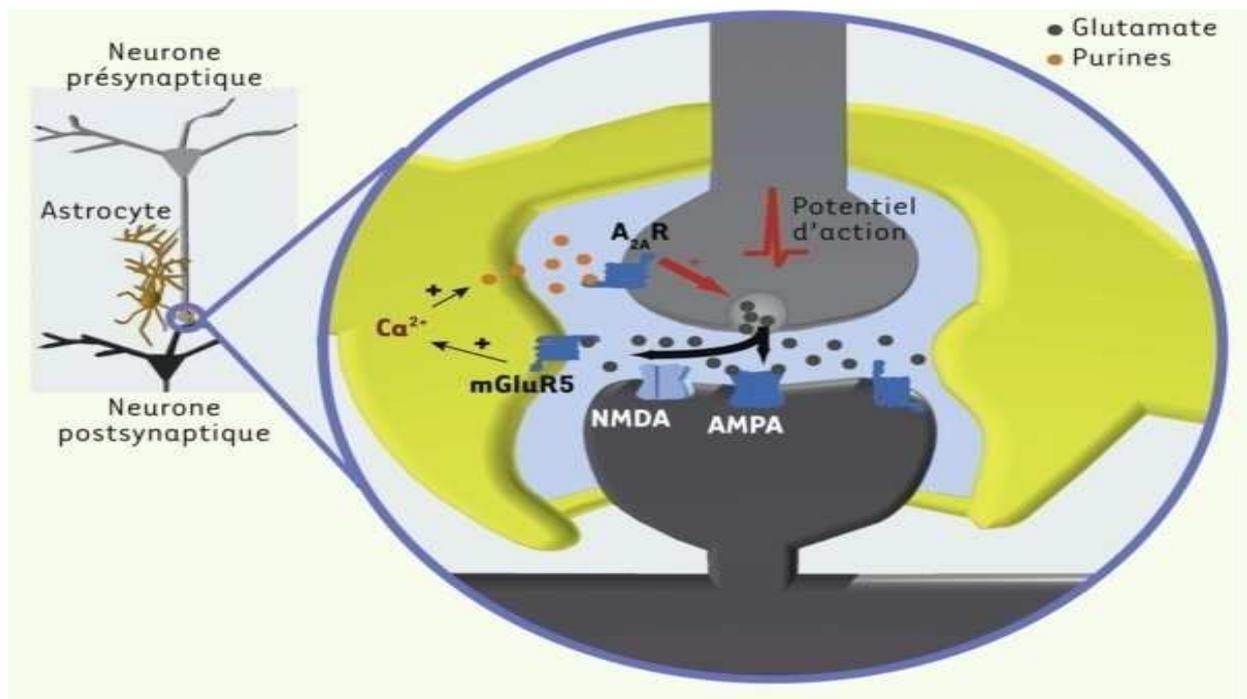


Figure 11 : Représentation schématique résumant l'implication des astrocytes au cours de la transmission synaptique de base.

« AMPA et NMDA représentent les récepteurs glutamatergiques de type AMPA et NMDA. MGluR5, récepteur métabotropique du glutamate de type 5 ; $A_{2A}R$, récepteur à l'adénosine de type A_{2A} » [Panatier et al. 2011].

❖ Les astrocytes contrôlent la neurogenèse dans le système nerveux central adulte.

Ces deux dernières décennies ont été celui de neurones immuables de la naissance à la mort [Oliet et al. 2001]. Deux zones du cerveau, la zone sous-ventriculaire et la zone sous-granulaire de l'hippocampe, abritent des cellules souches qui donnent naissance à de nouveaux neurones tout au long de la vie, y compris à l'âge adulte. Mais il existe également des cellules souches adultes capables de donner naissance aux différentes lignées cellulaires du système nerveux central, y compris des neurones dans d'autres régions du cerveau, comme le striatum ou la moelle épinière. Toutefois ces cellules restent quiescentes dans le contexte de la physiologie du système nerveux. D'où l'idée simple : l'environnement local conditionne la capacité des cellules souches adultes à proliférer et à se différencier. Reste à le démontrer et à en déterminer les mécanismes. Une étude de Fred Gage, l'un des pionniers du domaine avec Sam Weiss et Arturo Alvarez-Buylla, a récemment mis en évidence le rôle des astrocytes dans le contrôle de la neurogenèse dans l'hippocampe chez l'adulte [Barkho et al. 2006].

Pour suivre le devenir des cellules souches, les auteurs utilisent une technique préalablement décrite qui leur permet d'isoler de façon clonale des cellules souches d'hippocampe de rat adulte, puis de les transfecter avec un rétrovirus qui s'intègre dans le génome des cellules hôte, et permet l'expression du marqueur fluorescent (GFP) dans la descendance de ces cellules. En présence de FGF-2 (*fibroblast growth factor-2*), les cellules prolifèrent et restent indifférenciées. Les auteurs observent, après retrait du FGF-2, une différenciation spontanée en neurones (MAP2 $\alpha\beta$ +), oligodendrocytes (RIP+, GalC+) et astrocytes (GFAP+), dans une très faible proportion: 1 à 2 % des cellules. Cette proportion peut atteindre 5 % si les conditions de culture incluent la laminine, l'acide rétinoïque et le sérum de veau fœtal. Mais plus de 10 % de neurones ou d'astrocytes sont détectables si les cellules souches sont cultivées en milieu défini sur une monocouche d'astrocytes et de neurones prélevés sur des animaux nouveau-nés. La substitution des astrocytes par des fibroblastes est inefficace. Curieusement, une monocouche constituée seulement de neurones stimule la différenciation en oligodendrocytes, tandis qu'une monocouche uniquement composée d'astrocytes de l'hippocampe reproduit l'effet inducteur neurogénique. Les

astrocytes produisent donc un ensemble de facteurs solubles et transmembranaires qui favorisent la différenciation des cellules souches adultes en neurones. De plus, cet effet est dépendant du stade de développement, les astrocytes issus d'animaux nouveau-nés ayant un effet plus marqué que les astrocytes adultes. Il existe également une spécificité régionale: en effet, s'il existe des cellules souches isolées dans de multiples endroits du système nerveux central, y compris la moelle épinière, seuls les astrocytes de l'hippocampe sont capables de stimuler la neurogenèse. Les auteurs indiquent même que les astrocytes de la moelle épinière stimulent préférentiellement la différenciation en astrocytes et en oligodendrocytes, sans toutefois détailler les données [Song et al. 2002].

❖ **Inflammation et réponse immunitaire.**

Les astrocytes peuvent exprimer les antigènes du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I et II et sont capables de présenter l'antigène in vitro. L'expression du CMH de classe II peut être induite ou régulée par des cytokines, des neurotransmetteurs et des neuropeptides. Ces cellules induisent la réponse immunitaire primaire aux lymphocytes T, en favorisant plutôt l'apoptose des lymphocytes T que leur prolifération. Ainsi, ces cellules peuvent participer à la réponse immunitaire après infection. La protection contre toute infection par les astrocytes se fait également par un contrôle de l'entrée de substances par la barrière hémato-encéphalique délimitée par les prolongements astrocytaires.[Chauhan et al. 2014].

VI.2. Les cellules microgliales.

VI.2.1. Définition.

Les cellules microgliales sont les macrophages résidents du système nerveux central (SNC). Elles représentent environ 10 % des cellules gliales du cerveau. Depuis leur mise en évidence par Pio del Rio-Hortega (1882-1945), de nombreux travaux ont démontré leur fonction macrophagique dans le tissu nerveux [Kettenmann et al. 2011]. En situation physiologique, les cellules de la microglie interagissent continuellement avec leur environnement en projetant des extensions qui « analysent » les cellules environnantes [Audinat et Arnoux, 2014]. Ce comportement de surveillance leur

permet de détecter toute altération de leur environnement immédiat. En réponse à une situation pathologique, ces cellules vont rapidement proliférer et s'activer pour adopter un phénotype analogue à celui des macrophages activés. Elles sont alors capables d'éliminer les débris cellulaires (fonction macrophagique), et de sécréter des facteurs immunorégulateurs (cytokines) et des facteurs de croissance. Cependant, si leur activation persiste, elles peuvent aussi avoir un rôle néfaste pour les autres cellules du SNC en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires et des facteurs cytotoxiques [Kettenmann et al. 2011].

VI.2.2. Principaux rôles physiologiques des microglies.

❖ Rôle dans le développement du système nerveux.

La présence de ces cellules dans le SNC embryonnaire est connue depuis les années 1930, mais leur processus d'invasion et leur rôle dans le développement précoce du SNC commencent seulement à être élucidé. Un nombre croissant de données indiquent, notamment, que la microglie embryonnaire pourrait jouer un rôle important dans le développement normal des réseaux de neurones [Pont-Leziza et al. 2011] et, peut-être, représenter un des acteurs impliqués dans des pathologies psychiatriques comme la schizophrénie et l'autisme [Roumier et al. 2008 ; Pont-Leziza et al. 2011].

Au cours du développement normal du SNC, un nombre important de neurones sont éliminés par apoptose et la microglie régule ce processus [Legendre et al. 2014]. Mais, il y a aussi une production de synapses en excès qui sont éliminées par des mécanismes dépendant en partie de l'activité neuronale lors de la maturation des réseaux synaptiques. Des observations récentes indiquent que, durant le développement postnatal de l'hippocampe et du thalamus de la souris, des éléments pré- et postsynaptiques ont été observés à l'intérieur de cellules microgliales (Figure 11). Cela suggère que celles-ci sont impliquées dans la phagocytose de synapses surnuméraires devant être éliminées [Paoliceli et al. 2011 ; Schofer et al. 2012]. Dans le thalamus en développement, la phagocytose des terminaisons des fibres rétiniennes est dépendante de l'activité neuronale et met en jeu des éléments du système du complément, mieux connu pour son rôle dans le système immunitaire. Il semble que les synapses « faibles » devant être éliminées sont étiquetées par l'expression de la

composante C3 du complément, qui agit comme un signal « mange moi » (*eat me*) sur la microglie, qui est la seule composante du SNC à exprimer le récepteur de C3. Chez les animaux invalidés pour C3 ou son récepteur microglial C3R, la phagocytose des terminaisons rétiniennes par la microglie est diminuée et la connectivité synaptique de cette voie rétino-thalamique ne subit pas une maturation normale [Schofer et al. 2012]. La disponibilité de la microglie aux sites d'élimination synaptique est bien entendu un facteur limitant pour que cette phagocytose ait lieu. Dans l'hippocampe d'animaux invalidés pour le récepteur CX₃CR1 de la fractalkine, l'augmentation de la densité microgliale est retardée pendant les premières semaines de vie. Ce déficit transitoire du nombre de microglies s'accompagne d'un plus grand nombre d'épines dendritiques sur les neurones, suggérant un déficit d'élimination des synapses surnuméraires. De façon intéressante, ces anomalies structurelles s'accompagnent d'un retard de maturation des propriétés fonctionnelles du réseau neuronal [Paoceli et al. 2011]. Cependant, le lien entre phagocytose microgliale et maturation fonctionnelle des synapses n'est pas clairement établi, et d'autres fonctions microgliales pourraient expliquer ces observations (Figure 12).

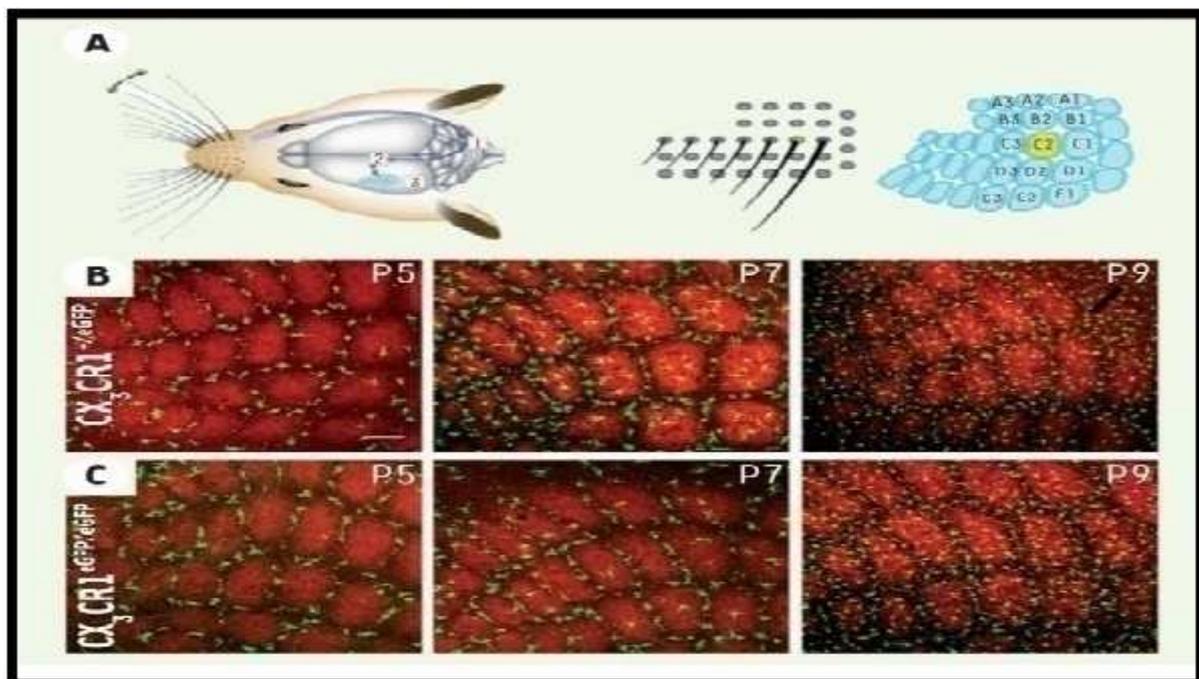


Figure 12 : Microglie et maturation des synapses. « A. Schéma du système sensoriel des vibrisses chez les rongeurs et correspondance entre la disposition des vibrisses du museau et les tonneaux dans la couche 4 du cortex somato-sensoriel. B. Evolution de

la distribution de la microglie (vert) dans le champ des tonneaux de la couche 4 du cortex entre le cinquième et le neuvième jour postnatal chez des souris hétérozygotes pour le récepteur microglial de la fractalkine. C. Même expérience réalisée avec des souris invalidées pour le récepteur de la fractalkine »[Petersen, 2007 ; Hoshoko et al. 2012].

❖ **Les microglies contrôlent la neurogenèse.**

La première démonstration convaincante d'un rôle de la microglie dans la neurogenèse n'a été faite que récemment [Cunningham et al. 2013]. En combinant des marquages immunohistochimiques chez le macaque, le rat et la souris, et la technique d'ablation pharmacologique des cellules microgliales *in vitro* et *in vivo*, Cunningham *et al.* ont montré que les cellules microgliales régulent le nombre des cellules progénitrices neurales dans le cortex en développement [Cunningham et al. 2013]. À la fin de la neurogenèse corticale, les cellules microgliales phagocytent des précurseurs neuraux situés dans la zone ventriculaire et sous-ventriculaire, et ce en l'absence de tout signe détectable de mort cellulaire. Cette étude montre que l'activation des cellules microgliales embryonnaires par le lipopolysaccharide, un composant essentiel de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, augmente la phagocytose des précurseurs neuraux et en fait diminuer leur nombre. Bien que le rôle de l'activation microgliale dans des pathologies neuro-développementales fait encore largement débat, les travaux de Cunningham *et al.* offrent une piste de recherche pour explorer les conséquences de l'altération du phénotype microglial pendant la gestation sur le développement du SNC [Cunningham et al. 2013].

Chez l'embryon, la microglie n'agirait pas seulement sur le développement neuronal, mais aussi sur le développement de la vascularisation du SNC [Arnold et Betsholtz, 2013]. Dans le SNC, le développement des vaisseaux sanguins se fait exclusivement par angiogenèse. Au cours du développement embryonnaire, les vaisseaux en croissance font de façon itérative des extensions, des branchements et de l'anastomose vers le centre du tube neural où ils forment un plexus transitoire autour des ventricules du cerveau et autour du canal central de la ME [Arnold et Betsholtz, 2013]. C'est durant la formation de ces plexus vasculaires transitoires que les cellules microgliales

contactent les vaisseaux sanguins. Le rôle de la microglie dans l'angiogenèse a été mis en évidence grâce à l'utilisation de souris dépourvues de cellules microgliales (les souris transgéniques PU.1KO et les souris mutantes ostéopérotique *csf1* [*colony stimulating factor 1*] *op/op*) et dans des modèles d'ablation pharmacologique de la microglie [Arnold et Betsholtz, 2013]. Les souris transgéniques PU.1KO meurent à la naissance et sont aussi dépourvues de macrophages, de lymphocytes B, de mastocytes, de neutrophiles et d'érythroblastes précoces, alors que les souris *csf1 op/op* sont dépourvues de macrophages et d'ostéoclastes. Dans ces modèles, la suppression de la microglie au cours du développement aboutit à une diminution des branchements vasculaires dans la rétine et le cerveau [Arnold et Betsholtz, 2013]. Cependant, les mécanismes moléculaires qui sous-tendent le rôle de la microglie dans la mise en forme du plexus vasculaire naissant sont encore inconnus [Arnold et Betsholtz, 2013]. L'ensemble de ces découvertes ouvrent un nouveau champ de recherche qui permettra de mieux comprendre comment les interactions entre la microglie et les neurones régulent le développement du SNC et pourraient être à l'origine de pathologies neuro-développementales.

❖ **Fonctions immunitaire et inflammatoire** (Harry, 2013).

Les microglies sont les macrophages résidents du SNC et ce sont les premières cellules du SNC qui sont activées lors d'une infection ou d'un traumatisme. Ces cellules expriment les antigènes du CMH de classe I et II et lors de leur activation, l'expression de plusieurs marqueurs antigéniques identiques à ceux des monocytes circulant est augmentée, dont les antigènes du CMH de type II. Elles expriment également les récepteurs aux Fc (région constante des anticorps) et aux molécules du complément ainsi que le marqueur CD4. Lors d'une infection dans le SNC ou une exposition à des stimuli inflammatoires, les microglies sont activées pour exercer leurs fonctions immunitaires comprenant la libération de cytokines pro-inflammatoires, la cytotoxicité et la régulation des réponses médiées par les lymphocytes T par présentation de l'antigène. Les microglies activées peuvent également se transformer en macrophages et phagocyter les éléments étrangers et les débris cellulaires [Ji et al. 2013].

❖ **Fonctions de neuroprotection.**

Le rôle neuroprotecteur des microglies se manifeste au niveau de l'élimination du glutamate, du fer et par la sécrétion de neurotrophines. Le glutamate est un neurotransmetteur exciteur, qui, lorsqu'il est présent en grande quantité dans la synapse, peut entraîner la mort des cellules neuronales. Ainsi, les microglies, comme les astrocytes, jouent un rôle important dans l'élimination du glutamate libéré dans les synapses par récapage. De plus, les microglies sont impliquées dans le métabolisme du fer dans le cerveau. En effet, le fer est essentiel dans le métabolisme mais peut être délétère pour le SNC s'il n'est pas éliminé rapidement. Les microglies promeuvent la survie neuronale lors d'une lésion par la sécrétion de neurotrophines. Ainsi, les microglies semblent constituer une population cellulaire nécessaire au maintien d'un environnement favorable pour les neurones. Cependant, des travaux récents suggèrent que les microglies pourraient aussi jouer un rôle néfaste dans la neurogénèse via la libération de l'IL-6 [Vinet et al. 2012 ; Domercq et al. 2013].

❖ **Fonctions neurotrophiques.**

L'addition d'un milieu conditionné par les microglies dans des cellules neuronales embryonnaires conduit à la survie et au développement des neurones corticaux. Les microglies ont donc la capacité de sécréter des molécules neurotrophiques spécifiques [Chatterjee et al. 2013]

❖ **Implication dans la neurodégénération.**

Lors d'une lésion cérébrale, les microglies activées peuvent soit induire la mort cellulaire par la sécrétion de cytotoxines comme le glutamate ou le NO (monoxyde d'azote), soit promouvoir la croissance et la survie neuronale. Ainsi, les microglies possèdent la capacité de détruire les cellules nerveuses trop détériorées tout en favorisant la survie des neurones encore viables. Avec l'âge, le nombre de microglies augmente et leur phénotype est modifié, elles expriment des antigènes qui sont très peu exprimés voire inexistantes dans le cerveau juvénile en particulier le CMH de type II. Ces modifications du phénotype, induisant une activation constitutive des microglies, entraîne une neurodégénération cérébrale [Perry et O'Connor, 2010].

VI.3. Douleur neuropathique et réactivité gliale.

VI.3.1. Introduction.

Après les stimuli et les lésions douloureuses, la glie présente des altérations variables des fonctions et de la morphologie notamment : (1) les changements ioniques (par exemple, augmentation du Ca^{2+} astrocytaire); (2) la régulation post-traductionnelle (par exemple, la phosphorylation des protéines kinases activées par les mitogènes [MAPK]); (3) la modulation de la transcription et de la translation (par exemple, modulation de molécules de surface, des marqueurs gliaux, des médiateurs pro- et anti-inflammatoires); (4) les changements morphologiques (par exemple, l'hypertrophie); et (5) la prolifération. Ces modifications sont associées à différents états d'activation des cellules gliales (Figure 12). Ci-dessous nous citons des états d'activation qui sont souvent étudiés dans le domaine de recherche sur la douleur.(Figure 13)

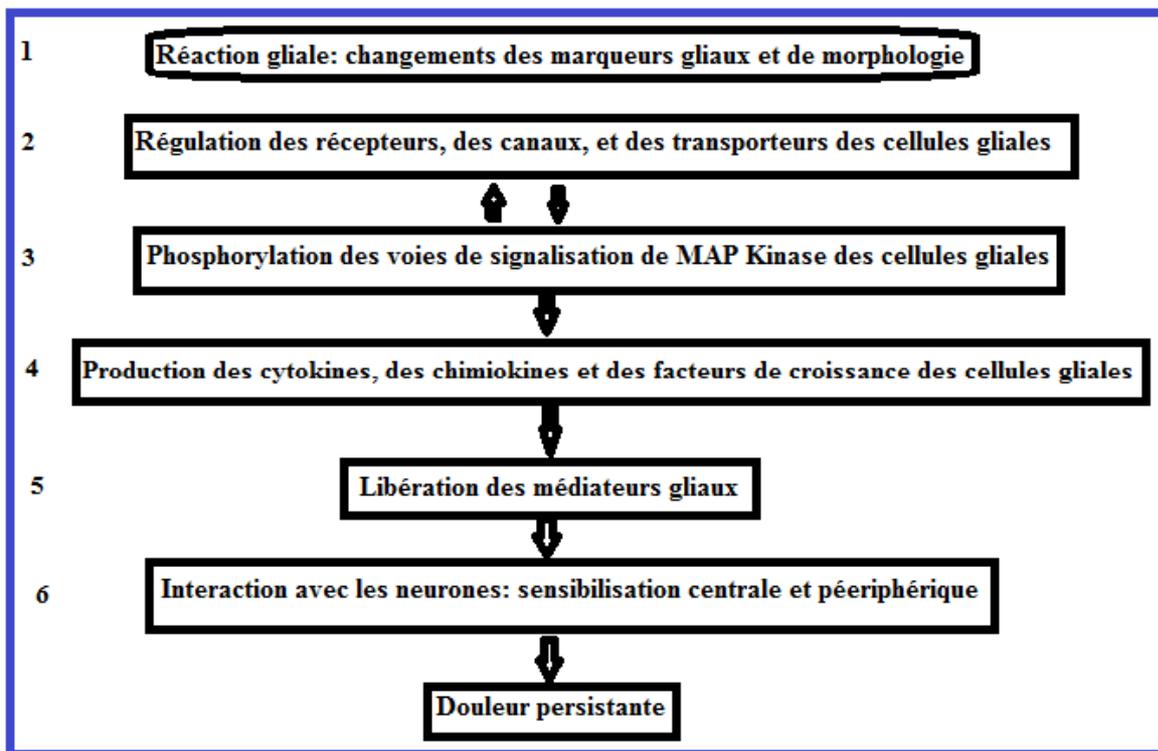


Figure 13 : Différentes étapes d'activation des cellules gliales.

« Les différentes étapes d'activation gliale après des lésions douloureuses. (1) la réaction gliale se réfère à une régulation positive des marqueurs gliaux et des changements morphologiques des cellules gliales (gliose); (2) la régulation positive des récepteurs gliaux tels que les récepteurs de l'adénosine triphosphate (ATP), les récepteurs de chimiokines et les récepteurs Toll-like, ce qui conduira à l'étape

d'activation: (3) l'activation des voies de signalisation intracellulaires, comme la voie de Mitogen-activated protein kinase (MAPK). La phosphorylation de MAPK conduira à l'étape d'activation suivante: (4) la régulation positive des médiateurs gliaux, tels que les cytokines, les chimiokines, et les facteurs de croissance. Lors de la libération, ces médiateurs gliaux peuvent interagir avec les neurones pour susciter la douleur via la sensibilisation centrale et périphérique »[Jha et al. 2012].

VI.3.2. La réactivité gliale.

La plupart des études définissent l'activation gliale comme la régulation positive des marqueurs gliaux tels que la CCR3 / CD11b, l'IBA1, et la GFAP, qui sont souvent, mais pas toujours, associés à des changements morphologiques (par exemple, une hypertrophie ou d'un procédé de rétraction / extension) [Jha et al. 2012].

– La réaction microgliale.

Plusieurs études ont montré que la lésion du nerf périphérique est accompagnée de la réaction microgliale (microgliose) dans la moelle épinière. En outre, cette réaction est fonction de l'origine de la lésion. Par exemple, la réaction est importante dans les lésions de la moelle épinière, mais aussi dans la douleur neuropathique diabétique induite par la Streptozotocine, l'exposition chronique aux opiacés et l'incision chirurgicale. Cependant, la réaction de la microglie est moins évidente dans le cancer des os et la neuropathie induite par la chimiothérapie [Honore et al. 2000 ; Zheng et al. 2011 ; Zhang et al. 2012].

– La réaction astrocytaire.

Comparer à la réaction de la microglie, la réaction des astrocytes dans la moelle épinière est plus générale et évidente après des lésions douloureuses [Gao et Ji, 2010]. La réaction des astrocytes est induite non seulement par un traumatisme du nerf et des lésions de la moelle épinière, mais aussi par une exposition chronique aux opioïdes [Song et Zhao, 2001], par l'injection intraplantaire ou intra-articulaire de CFA [Guo et al. 2007 ; Gao et al. 2010], de l'os [Honore et al. 2010] et le cancer de la peau [Gao et al. 2009], la chimiothérapie, et la neuropathie induite par le virus de l'immunodéficiência humaine (VIH) [Zhang et al. 2012]. En outre, il semble que la

réaction astrocytaire est plus persistante que la réaction de la microglie. Il a été montré que la régulation positive des pics de GFAP et de CD11b respectivement à 150 et 14 jours après une lésion nerveuse [Zhang et Koninck, 2006]. Bien que la plupart des études ont porté sur la réaction gliale dans la moelle épinière et le tronc cérébral, la réaction des astrocytes a été également trouvée dans le cerveau, telles que le cortex cingulaire antérieur, ce qui contribue à la douleur affective [Chen et al. 2012]. Il est à noter que l'immunohistochimie de certains anticorps notamment la GFAP peut détecter des changements de conformation ou de solubilité ou de modifications post-traductionnelles de la protéine, mais pas des changements réels dans l'expression des protéines, en raison de différentes conditions de fixation [Bell et al. 1987, Eng et al. 2000]. Ainsi, il est optimal pour valider les résultats de GFAP immunohistochimique avec des anticorps différents et différentes méthodes telles que le Western Blot et la réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR).

VII. CLERODENDRUM FORMICARUM.

VII.1. Description

Clerodendrum formicarum est une plante à liane brunâtre munie de lentilles jaunâtre. La tige angulaire, avec épines résultant de la chute des feuilles. Chaque verticille contient trois à quatre feuilles. Les fleurs sont petites et blanches.

Sa taxonomie est la suivante :

- **Synonyme** : *Clerodendrum formicarum*.
- **Phylum** : Magnoliophyta
- **Classe** : Magnoliopsida
- **Ordre** : lamiales
- **Famille** : Lamiaceae.
- **Genre** : Clerodendrum
- **Espèces** : formicarum.

VII.2. Distribution géographique.

Le genre *Clerodendrum* est diversifié et distribué en Asie, en Australie, en Afrique et en Amérique [Ali et al. 2010a]. Cependant l'espèce *Clerodendrum formicarum* est principalement présente en Afrique tropicale (Figure 14) [Ali et al. 2010b].



Figure 14 : Distribution naturelle de l'espèce *Clerodendrum formicarum*.

VII.3. Composition phytochimique.

Par technique spectroscopique à Résonance Magnétique 1D et 2D, les composés suivants ont été isolés des feuilles de cette plante. Ils comprennent : les dérivées de l'acide salicylique nommées acide formoïque A et B et d'autres acides : l'acide Flemingipanique, Martynoside, Verbascoside et Sequinoside. [Ali et al. 2010a].

VII.4. Propriétés médicinales et usages traditionnels.

La médecine traditionnelle est utilisée dans le monde et a une importance économique croissante. Dans les pays en développement, la médecine traditionnelle est souvent le seul traitement accessible, abordable et disponible [Bussmann, 2013].

Clerodendrum formicarum a été souvent utilisé pour diverses pathologies notamment la céphalée, les douleurs chroniques, le rhumatisme et les épilepsies ; et il est appliqué de différentes façons. Par exemple, les feuilles de la plante peuvent être utilisées par voie orale ou par scarification ou par application locale de la patte de feuilles pour traiter les douleurs chroniques (Figure 14). [Kibungu kembelo, 1984].

Clerodendrum formicarum est associé aussi à d'autres plantes pour avoir les effets escomptés. Pour traiter la céphalée par exemple, les feuilles de *Clerodendrum formicarum*, *Ocimum minimum* sont mélangés avec de la poudre rouge de *Pterocarpus angolensis* et de l'huile des noix de palme crues. Le mélange est utilisé en Frictionnant le front et le cou, 2 fois par jour. Pour traiter le rhumatisme ; griller le mélange des feuilles de *Euphorbia hirta* et de *Schwenckia americana*, *Clerodendrum formicarum*, *Desmodium lasiocarpum* et la peau du varan. Broyer ce mélange ensemble avec le sel ancestral. Faire des incisions ou tatouages aux endroits malades et frictionner dessus la poudre obtenue 1 fois par jour avec un intervalle d'1 jour [Kibungu kembelo, 1984].



Figure 15 : feuilles de *Clerodendrum formicarum*

DEUXIEME PARTIE :
TRAVAIL EXPERIMENTAL

I. MATERIELS ET METHODES.

I.1. Animaux.

Des rats Wistar mâles (n=50) pesant 128 à 280 g du Laboratoire de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles de l'UCAD ont été utilisés. Les animaux ont bénéficié d'un cycle jour/nuit de 12h, d'une température de $24^{\circ}\text{C} \pm 3$, ainsi que de nourriture et d'eau ad libitum. Ils sont hébergés dans des cages collectives par groupes de 5 ou 6. Les expérimentations ont suivi les directives éthiques données par l'Association Internationale pour l'Etude de la Douleur [Ziermann, 1983] ainsi que l'approbation du comité d'éthique de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar. Les animaux ont été acclimatés pendant 21 jours à l'animalerie avant tout début des expériences. Tous les tests ont été effectués durant la phase diurne de la journée (7h-19h).

I.2. Composition analytiques alimentaires des rats.

- Protéines : 15%
- Matières grasses : 4,1%
- Cellulose : 11%
- Matières minérales : 13%
- Protéines totales : 0,7%
- Calcium : 2,9%
- Autres : 53,3%

I.3. Le Matériel végétal.

Les feuilles Fraîches de *Clerodendrum formicarum* du nom vernaculaire au Congo « Makuku matatu » (Kikongo) ont été récoltées au département de la Sangha à Souanké (République du Congo) de coordonnées géographiques 2°05' Nord et 14°08' Est. Ces feuilles ont été identifiées par le spécialiste en botanique le Dr Pierre Mangala chercheur à l'IRD. Un dépôt de spécimen a été déposé au Conservatoire et Jardin Botanique de Genève (Suisse) et enregistré au n° 12344.

I.4. Préparation d'extraits de plante.

Les feuilles ont été séchées dans une étuve à 45 ° C avec circulation d'air pendant trois jours. Les feuilles ont été macérées et la poudre (500 g) a été soumise à une extraction avec 1 litre d'éthanol à 95% trois fois à la température ambiante. La durée de chaque extraction est de 72 h. La solution d'extraction est concentrée sous vide dans un évaporateur rotatif pour donner 20 g d'extraits bruts. Ces extraits bruts ont été utilisés pour cette étude [Taussef et al. 2013].

I.5. Induction du diabète et administration des médicaments.

Le diabète expérimental a été induit chez le rat par une injection unique de 150 mg / kg d'Alloxane monohydrate (Sigma-Aldrich, St. Louis, États-Unis) par voie sous-cutanée (sc) à des rats du groupe (GA). Les animaux répartis en cinq groupes et ont été isolés pendant 18 heures avant l'expérimentation. Les Tests de comportement décrits ci-dessous ont été appliqués à chaque rat avant et pendant l'expérience. Dans un premier temps, les rats ont été injectés avec 0,5 ml de la solution saline à 0,9% (Normal) (GC, n = 10), d'Alloxane monohydrate (150 mg / kg) (GA, n = 40). Les rats diabétiques neuropathiques douloureux sont divisés en 5 groupes; le groupe recevant les extraits de feuilles de *Clerodendrum formicarum* (ECF) à la dose de 100 mg / kg, 150 mg / kg et 200 mg / kg de poids corporel, le groupe standard (Pre-G.) a reçu du prégabaline (10 mg / kg) et le groupe contrôle de rats neuropathiques diabétiques douloureux sous 0,9% de solution saline (ND + S). Tous les médicaments ont été administrés par voie sous-cutanée et les doses ont été déterminées par rapport à ceux de la dose quotidienne utilisée en médecine traditionnelle et en tenant compte du métabolisme des rats élevés par rapport à ceux des humains [Orman et al. 2011].

I.6. Détermination de la toxicité générale.

La toxicité aiguë ont été déterminée chez les rats Wistars sous ECF à des doses différentes de 100 mg / kg; 150 mg / kg et 200 mg / kg. Les animaux (n = 5 dans chaque groupe) ont été soumis à un jeûne pendant une nuit avant l'expérience. Les animaux ont été observés individuellement pendant les quatre premières heures après l'administration des médicaments. Les signes cliniques, tels que les modifications des

poils de la peau, larmolement, salivation, horripilation, diarrhée, et la mortalité ont été notés. Les animaux ont été observés pendant une période de 24 heures supplémentaire pour s'assurer de leur état de santé.

I.7. Principe de la réflectométrie et mesure de la glycémie.

La réflectométrie est une méthode de diagnostic qui repose sur le principe du radar. Un signal de sonde est envoyé dans le milieu à diagnostiquer, ce signal se propage selon les lois de la propagation du milieu étudié et lorsqu'il rencontre une discontinuité (impédance), une partie de son énergie est renvoyée vers le point d'injection. L'analyse du signal réfléchi permet de déduire des informations sur le milieu considéré.

Le prélèvement du sang a été effectué au niveau de l'œil gauche de l'animal. La mesure de glycémie a été effectuée par un Lecteur destiné à la détermination quantitative à partir de sang capillaire frais et des bandelettes réactives Accu-Chek Active (Roche Diagnostics GmbH, Germany). Cette mesure est basée sur le principe de la réflectométrie. Les valeurs supérieures à 300 mg/dl ont été considérées comme positives. Les animaux positifs sont inclus pour les études comportementales.

I.8. Prélèvement de la moelle épinière.

Aussitôt après une anesthésie avec de l'isoflurane à 3%, une incision est réalisée au niveau de la carotide pour vider l'animal de son sang et éviter ainsi les tissus nerveux soient imbibés de sang. L'animal est placé en position ventrale sur du papier absorbant, puis la peau est incisée et l'axe vertébral dégagé sur toute sa longueur cervico-dorso-lombaire. Une laminectomie réalisée à l'aide d'une pince gouge permet d'extraire l'axe médullaire sans lésion tissulaire. A l'aide d'un scalpel, la moelle a été débarrassée des nerfs rachidiens dans une solution saline à 0,9% puis aussitôt congelée à -80° c sous azote liquide.

I.9. Etude comportementale

L'étude comportementale a été réalisée par deux expérimentateurs afin de bien comparer les valeurs. Les rats sont randomisés en groupe. Deux tests ont été utilisés pour déterminer une allodynie et une hyperalgésie mécanique Statique : le test de

Filaments de Von Frey et le test de pression sur la patte (test de Randall et Selitto). Avant de procéder à ces études comportementales, les animaux ont été acclimatés à l'environnement pendant au moins 10 minutes. Les valeurs de référence mesurées un jour avant l'injection de l'Alloxane et de la Solution Saline et sont les suivantes : 18 g pour le test de filaments de Von Frey et 100 g pour le test de la pression de la patte.

I.9.1. Test de Filaments de Von Frey.

Les filaments de Von Frey (Touch Test®Bioseb, Chaville, France) sont des filaments en nylon de différentes tailles et diamètres (variations sur une échelle logarithmique) permettant d'exercer une pression calibrée à la surface de la peau. Les filaments utilisés permettent d'appliquer des pressions variant de 0,008 g à 300 g. Les rats sont placés sur une grille (maillage carré de 0,5 x 0,5 cm) dans des cages en plexiglas sans fond (dimension L x l x h = 24 x 14 x 33 cm) 10 min avant le début du test. Le test est réalisé en appliquant 5 fois le même filament sur la voûte plantaire de la patte postérieure et en comptant le nombre de retraits en commençant par le filament le plus faible. Les réponses de retrait sur les filaments de Von Frey des deux pattes arrière ont été comptées et ensuite exprimés comme une réponse globale en pourcentage, par exemple, si un rat a retiré 6 fois sur un total de 10 tests de Von Frey, cela a été enregistré comme une réponse globale de 60% (Figure 16) [Flatters et Bennett, 2004].



Figure 16 : les filaments de Von Frey.

I.9.2. Test de pression sur la patte.

L'Hyperalgésie mécanique a été déterminée en utilisant le test de pression sur la patte de Randall-Selitto (algésimètre Ugo Basile, 92370 Chaville) (Figure 16). La patte arrière du rat a été placée dans l'applicateur de pression, et un stimulus de pression sans cesse croissante (maximum de de 250 g) a été appliqué à la surface dorsale de la patte jusqu'au retrait ou la vocalisation. La pression a été enregistrée en tant que valeur de seuil nociceptif. Pour chaque animal, deux enregistrements ont été effectués pour chaque patte arrière, et les données ont été signalées comme la moyenne des deux valeurs de la patte arrière [Bang et al. 2010].



Figure 17 : Algésimètre Ugo Basile.

I.10. Western Blot.

I.10.1. La Préparation des Échantillons.

Après le traitement, les animaux (n = 5 pour chaque groupe) ont été sacrifiés par décapitation. La corne dorsale de la moelle épinière a été retirée et homogénéisée dans 5 volumes de tampon d'homogénéisation glacé contenant 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 1 mM NaVO₄, 0.01 mM PMSF, DTT, et 1% triton X-100 est centrifugée pendant 10 min à 10000 tours par minute. La teneur en protéines dans le surnageant a été déterminée par la méthode de Bradford. Chaque homogénat a ensuite été dilué dans du tampon d'homogénéisation de manière à équilibrer la teneur en protéines dans tous les échantillons.

I.10.2. SDS-PAGE et détection de chimioluminescence.

L'électrophorèse SDS-PAGE a été effectuée dans des conditions dénaturantes standards à 15 mA. Après électrophorèse, les protéines résolues ont été transférées (transfert semi-sec) sur la membrane de PVDF (Biorad). Le transfert a été effectué à 25 V pendant 2 h. Après le transfert, la membrane a été incubée en présence de 5% de lait écrémé dilué dans 0,1% TBST pendant 2 h à la température ambiante. La membrane a été incubée avec un anticorps monoclonal pour la c-Fos (1 :1000) , GFAP (1: 2500), CD11b (1: 5000), COX1 (1: 1000) et COX2 (1: 1000) dans une solution de blocage pendant une nuit à 4 ° C. La membrane a été soumise à trois lavages avec du TBST à 0,1% pendant 5 minutes chacun suivi d'une incubation avec 1: 7000 dilué de chèvre conjugué HRP IgG anti-rat (Santa Cruz Biotechnology, numéro de catalogue sc-2032) pendant 2 heures à température ambiante. La chimioluminescence luminol (Santa Cruz Biotechnology, numéro de catalogue sc-2048) a été utilisé pour la détection des bandes de protéines d'intérêt. Les images ont été scannées avec un densitomètre scanner (GS800, Bio-Rad), et la densité optique (DO) ont été analysées à l'aide des valeurs Quantity One software (Bio-Rad). Pour normaliser la protéine pour le chargement, des anticorps dirigés contre β -actine ont été utilisés.

I.11. PCR à temps réel (RT-PCR).

L'ARN total a été extrait des tissus de la corne dorsale de la moelle épinière par le réactif TRI (Sigma) selon les instructions du fabricant. Traité avec RNase DNase I (Roche, Indianapolis, IN, USA) et re-purifié, et ensuite quantifié par spectrophotométrie. L'ARN total (1 pg) a été utilisé pour une transcription inverse (RT Omniscript kit, Qiagen, Valencia, CA, USA) en utilisant les hexamères aléatoires d'amorces PCR. ADNc préparé à partir d'ARNm a été amplifié en utilisant les jeux d'amorces suivants:

β -actine :sens 5'-GCAGGAGTACGATGAGTCCG-3' et inverse 5'-

ACGCAGCTCAGTAACAGTCC-3'; GFAP : 5'-AGGGACAATCTCACACAGG-3 'et inverse 5'-GACTCAACCTTCTCTCCA-3'; CD11b : sens 5'-

CTGGGAGATGTGAATGGAG-3 'et inverse 5'- ACTGATGCTGGCTACTGATG-3

'; COX1 :sens5'-CAGCCCCTCATTACCCATT-3' et inverse 5'-
CCTGTTCTACGGAAGGTGGG-3'; COX2 :sens 5'-
TGAGTACCGCAAACGCTTCT-3 'et inverse 5' - TCTAGTCTGGAGTGGGAGGC-
3 ' ; c-Fos sens 5'-CCCGTAGACCTAGGGAGGAC-3 ' et antisens 5'-
CAATACACTCCATGCGGTTG-3'.

La PCR a été réalisée avec des quantités égales d'ADNc dans le système de détection de séquence Gene Amp 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), en utilisant SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Les réactions (volume total 25 µl) ont été incubées à 95 ° C pendant 10 min, suivi par 40 cycles de 15 s à 95 ° C et 1 min à 60 ° C. Chaque échantillon a été mesuré, et les points de données ont été examinés par analyse de l'intégrité de la courbe d'amplification. Le seuil du cycle d'amplification (Ct) a été comparatif à la méthode la quantification relative de gène utilisé pour l'expression. La quantité d'ARNm, normalisée pour le contrôle endogène (β -actine) et par rapport à un étalon, est donnée par $2^{-\Delta\Delta Ct}$, avec Ct indiquant le nombre de cycle auquel le signal de fluorescence du produit de PCR traverse un seuil arbitraire fixé au sein de la phase exponentielle de la PCR, et $\Delta\Delta Ct = [(Ct \text{ cible (inconnue échantillon)} - Ct \text{ control (échantillon inconnu)})] - [(Ct \text{ cible (échantillon de calibration)} - Ct \text{ Control (échantillon de calibration)})]$ comme décrit précédemment [Livak et Schmittgen , 2001].

I.12. ANALYSE STATISTIQUE.

L'analyse des données a été réalisée par le logiciel GraphPad Prism Software (version 5). Les résultats numériques de tests comportementaux sont exprimés en moyenne \pm erreur standard (SEM). Les résultats ont été statistiquement analysés en utilisant le test t'Student ou analyse unidirectionnelle de variance (ANOVA), suivie par les comparaisons post hoc de Tukey ou Dunnett pour comparer les résultats obtenus dans les groupes traités par le médicament et de contrôle. L'ANOVA à deux voies, suivies par la comparaison de Bonferroni ont été appliquées pour l'analyse statistique des effets obtenus dans les tests pharmacologiques. Dans tous les cas, $p < 0,05$ a été considérée comme significative. La méthode de log-probit (Litchfield et Wilcoxon, 1949) a été appliquée pour établir des doses efficaces médianes (ED50) pour ECF.

II. RESULTATS

Cette thèse rassemble trois travaux originaux qui sont présentés sous formes d'articles publiés.

Loubano-Voumbi G. ; Diaw M. ; Ouedraogo V. ; Sow A. K. ; Boumba L.M.A. ; Ba A.; Samb A. Characteristics of animal model of painful diabetic neuropathy induced by alloxan in subcutaneously in rats. **Journal of Global Bioscience** 2015, 4(6): 2478-2485.

Loubano-Voumbi G. ; Diaw M. ; Ouedraogo V. ; Sow A. K. ; Seck A. ; Boumba L.M.A. ; Ba A.; Samb A. Attenuation of allodynia and hyperalgesia by the leaves extracts of *Clerodendrum formicarum* in rat model of diabetic neuropathic pain. **Journal of Physiology and Pharmacology advances** 2015, 5(6):658-666.

Loubano-Voumbi G. ; Diaw M. ; Ouedraogo V. ; Sow A. K. ; Seck A. ; Boumba L.M.A. ; Ba A.; Samb A. Molecular analysis of *Clerodendrum formicarum* effects in painful diabetic neuropathy in rat. **World Journal of Neuroscience** 2015, 5(4): 258-269.

Article 1 : Caractéristiques du modèle animal de la douleur neuropathique diabétique induite par l'alloxane monohydrate en voie sous-cutanée chez le rat.

La neuropathie diabétique douloureuse est l'une des complications majeures de diabètes. Plusieurs modèles animaux de neuropathie diabétique douloureuse ont été développés basés principalement par des manipulations diététiques, génétiques et par des substances chimiques induisant une insuffisance pancréatique. La Streptozotocine et l'Alloxane monohydrate sont les deux substances chimiques les plus utilisées et le diabète est induit par voie intra-péritonéale après plusieurs jours d'injection de la composante chimique. En plus la voie intra-péritonéale serait plus traumatisante. Bien que la voie sous-cutanée soit utilisée dans certaines études animales, cependant il n'y a pas d'étude à notre connaissance qui a eu à utiliser cette voie pour induire la douleur. L'objectif de cette étude était d'évaluer les caractéristiques de ce modèle animal de douleur neuropathique diabétique induite par l'alloxane en sous-cutanée.

Nous avons d'abord déterminé l'état de santé des animaux par la prise du poids corporel et de la mesure de la glycémie. Les paramètres ont été déterminés au 3^e, 7^e, 14^e et 21^e jour après injection de l'alloxane monohydrate. Le résultat montre une diminution du poids corporel à partir du 15^e jour et une hyperglycémie à partir du 3^e jour. Ces résultats suggèrent une altération de la santé de l'animal.

Ensuite, nous avons déterminé par le test de filaments de Von Frey l'allodynie mécanique et par le test de pression sur la patte l'hyperalgésie mécanique. Les résultats ont montré l'apparition d'une allodynie mécanique au 14^e jour et une hyperalgésie mécanique au 21^e jour après injection de l'alloxane monohydrate (150mg/kg). Ces résultats confirment la présence de la douleur neuropathique.

Enfin, nous avons évalué l'expression protéique de c-Fos qui est un marqueur d'activation neuronale par Western Blot et de son ARNm par rt-PCR.

Les résultats montrent une surexpression de c-Fos à partir du 21^e jour. Ces données suggèrent une lésion neuronale.

En conclusion, ces résultats montrent que l'injection de l'alloxane monohydrate par voie sous-cutanée chez le rat, entraîne une altération de l'état de santé l'animal et une douleur neuropathique due à l'hyperglycémie.



Research Paper

CHARACTERISTICS OF ANIMAL MODEL OF PAINFUL DIABETIC NEUROPATHY INDUCED BY ALLOXAN IN SUBCUTANEOUSLY IN RATS

GHISLAIN LOUBANO-VOUMBI ¹, MOR DIAW ¹, VALENTIN OUEDRAOGO ¹, ABDOU KHADIR SOW ¹, LUC MAGLOIRE ANICET BOUMBA ², ABDOULAYE BA ¹ and ABDOULAYE SAMB ¹

¹Laboratory of Physiology and Functional Exploration.
Cheikh Anta Diop University of Dakar.
Faculty of Medicine, of Pharmacy and Odontology.
Dakar – Senegal.

²Laboratory of General Hospital of Loandjili
Pointe-Noire- Congo.

Abstract

Animal models of painful diabetic neuropathy were made the subject of several studies. They are mostly induced by chemicals causing intoxication of the pancreas. The ultimate route of administration for these substances is the intraperitoneal route. The deadline by which mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia appears varies according to the authors. In our study, we suggest the subcutaneously which is least used to have the characteristics of this model. The objective of this work is to evaluate the animal model of painful diabetic neuropathy by alloxan in subcutaneously. Male Wistar rats were used to induce painful diabetic neuropathy by a single injection of alloxan monohydrate (150mg / kg). Evaluation of mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia was carried out respectively by the Von Frey Filaments Test, and the Randall-Sellito Test. Molecular analysis of the expression of c-Fos that is a neuronal activation marker was carried out by Western blot and quantitative RT-PCR. Our results showed that mechanical allodynia appears from 14th day and mechanical hyperalgesia from the 21st day. Molecular analysis of the expression of c-Fos mRNA shows an increase in mRNA levels of this marker. These results therefore showed the simplicity of this administration route and the speed of appearance of the characters of pain.

Key words: Pain; Diabetic Neuropathy; Alloxan monohydrate; subcutaneously; Mechanical Allodynia ; Mechanical hyperalgesia.

INTRODUCTION

Diabetic neuropathy is one of the major complications of diabetes. It is a common cause of peripheral neuropathy. [1].The prevalence of neuropathy in diabetic patients worldwide is around 30 to 60% according to the authors. This painful neuropathy varies between 8-65% [2]. In 2030, about 472 million people will suffer from diabetes and 236 million neuropathies [1]. Animal models in diabetes research are numerous and most existing models are developed as a conventional model either type 1 or type 2. But very often a classic model of diabetes cannot

demonstrate the specific pathogenesis of complications related to diabetes [3;4]. Therefore, it is necessary to continue seeking a model of specific diabetes complications and reflecting the human disease [5]. Several animal models of diabetic neuropathy have been developed; this is experimental models of spontaneous diabetes or dietary manipulations, or by genetic or chemotherapy-induced pancreatic insufficiency (Streptozotocin, alloxan) [6]. These chemotherapy-induced models of painful diabetic neuropathy in streptozotocin or alloxan mostly use the intraperitoneal route and the Streptozotocin as toxic [7]. However, the intraperitoneal route is more traumatic to the animal and induction of diabetes with Streptozotocin requires several days [8]. Thus, we make an assumption about the characteristics of the animal model of painful diabetic neuropathy induced by alloxan subcutaneously.

The objective of our study is to evaluate the animal model of Painful diabetic neuropathy by alloxan subcutaneously in the Wistar Rat, which could allow us to have ideal choices for product administration and the less traumatic animal model for animal experimentation.

MATERIALS AND METHODS.

ANIMALS

Male Wistar rats (125-280 g) from the pet's Laboratory of Physiology and Functional Exploration of Cheikh Anta Diop University of Dakar were used. The animals were given a day / night cycle of 12 hours, with a temperature of $24^{\circ}\text{C} \pm 3$ as well as food and water ad libitum. They were housed in collective cages in groups of 5 or 6. The animals were acclimated for 21 days at the pet before the experiments. All the tests have been carried out during daytime (7h-19h). The ethical guidelines of the International Association for the Study of Pain (AISP) [9] have been respected and the study was approved by the ethics committee of the Cheikh Anta Diop University of Dakar.

PHARMACOLOGICAL TREATMENT

Experimental diabetes was induced in Wistar rats with a single injection of 150 mg / kg of alloxan monohydrate (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) by subcutaneous (sc). Alloxan was prepared by the 0.9% saline solution. The control rats received a dose of 4 ml / kg of 0.9% saline solution.

MEASUREMENT OF BLOOD GLUCOSE

Blood glucose was determined by a player Accu-Chek Active (Roche Diagnostics GmbH, Germany) for the quantitative determination from capillary blood and test strips. The hyperglycemia threshold value was set at 300 mg / dl [Xu and al. 2011].

BEHAVIORAL STUDY

The behavioral study was conducted by two experimenters to properly compare values. It was conducted with repeated measurements through the use of different tests for assessing peripheral sensory neuropathy: the Von Frey Filaments test and the Randall-Selitto Test [10;11]. Before these behavioral studies, animals were acclimated to the environment for at least 10 minutes.

Mechanical Allodynia test (Von Frey Filaments).

Mechanical allodynia is a technique based on the progressive application of von Frey filaments weighing from 0.16 to 26 g on on the plantar surface of the hind legs of the animals. The rats were placed in a Plexiglas cage and were acclimated for 20 minutes before testing. Five separate tests for 3 minutes was required to validate or not the motor response of the animal. Painful diabetic neuropathy in rats was materialized by a withdrawal movement or described in terms of the tab. A positive response was considered when the animal withdraws the paw abruptly to mechanical stimulus Von Frey filaments to more than 50% [12].

Mechanical Hyperalgesia Test (Randall-Selitto test).

Prior to testing, each animal received 5 minutes to accommodate so get used to handling; then it was placed in a soft cotton cloth and carefully locked with the same hand used to hold the tested leg. The test involves using the stylus of a mechanical pacemaker activated by the experimenter (algometer Ugo Basile, 92370 Chaville) to exert increasing pressure on the dorsum of the right hind paw of the rat. The pressure threshold is determined during the gradual increase of the

applied pressure that corresponds to the pressure at which the rat trying to withdraw its paw (withdrawal threshold) which is a reflex movement involving spinal neural network. The application point has been marked with ink in order to maintain the location during the repeated testing. The maximum applied force was limited to 250 g to prevent damage to the skin of the animal [13].

SAMPLING OF SPINAL CORD.

The animals were anesthetized with 3% isoflurane in oxygen delivered via a mask mounted on the nose and mouth of the animal. Rectal temperature was monitored and kept constant (37.5 ± 0.2 ° C) rats by placing in a temperature controlled key. The animal is placed in the prone position on absorbent paper, then the skin is incised and the vertebral axis cleared its entire Neck thoracolumbar length. Laminectomy performed using a rat to retrieve the medullary axis without tissue damage. Using a scalpel, the marrow is cleansed of spinal nerves in a 0.9% saline solution and immediately frozen at -80 ° C in liquid nitrogen. L5 and L6 section was used [14].

C-FOS EXPRESSION BY WESTERN BLOT.

For Western blotting, tissue samples were homogenized by sonication in a protein extraction buffer containing 50 mmol / L Tris, pH 7.5, 150 mmol / L NaCl, 1 mmol / L EDTA Na₂ dihydrate 2% sodium dodecyl sulfate, 1 mmol / L dithiothreitol, 1 mmol / L phenylmethylsulfonyl fluoride, containing protease inhibitors and phosphatase (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). 20µg of lysate were loaded and separated by electrophoresis on 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The proteins incorporated in the gel were then transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (PVDF). The membranes were washed with TBS-Tween 0.1% buffer, and then incubated with 5% nonfat dry milk for 30 minutes at room temperature. Then, they were incubated with anti-c-Fos (1: 1000; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) overnight on a shaker at 4 ° C. After three washes with 0.1% TBS-Tween, the membranes were incubated with a secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase goat anti-rat IgG (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) diluted 1: 1500 for 45 minutes and the membrane was washed 3 times in TBS-Tween and the proteins were revealed using the Chemiluminescence Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). Images were scanned with a Densitometer Scanner (GS800, Bio-Rad), and optical density (OD) values were analyzed using Quantity One software (Bio-Rad). To normalize for protein loading, antibodies directed against β-actin were used, and the proteins expression level was expressed as a relative value to that of β-actin.

GENE EXPRESSION BY QUANTITATIVE RT-PCR.

The RNA of the cells was obtained by phenol-chloroform extraction methods standards using a cDNA synthesis kit, iScript cDNA (Bio-Rad, USA). Total RNA solution of 1µl was used for the reaction. It was performed by denaturation of RNA for 5 minutes at 65 ° C followed by reverse transcription at 37 ° C for 1 hour and finally by the inactivation of the enzyme at 95 ° C for 10 minutes.

Five micrograms of cDNA obtained by RT reaction was incubated with 1 U of Taq polymerase (Qiagen, USA), 1 µM of each primer, 0.5 mM each dNTP, 1.5 mM MgCl₂, in a buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 8.3 and 50 mM KCl. The primers were synthesized in order to be compatible with the sequence of the rat gene. The primer sequence for GAPDH were: 5'-AATGGGAGTTGCTGTTGAAG-3' (sense), 5'-CTGGAGAAACCTGCCAAGTA-3' (antisense); the primer sequence for c-Fos were: 5'-CCCGTAGACCTAGGGAGGAC-3' (sense), 5'-CAATACACTCCATGCGGTTG-3' (antisense). PCR conditions are as follows: initial denaturation at 94 ° C for 1 minute; for the PCR cycles: denaturation at 94 ° C for 30 s, annealing at 55 ° C for 30 s and elongation at 72 ° C for 30 sec. The last cycle is followed by a final extension at 72 ° C for 7 min. All reactions were performed at 35 cycles in a thermal cycler C1000 Touch (Biorad, USA). The variation in the copy number of the target gene was determined by the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$ where $\Delta\Delta CT = [CT \text{ of the target gene} - CT \text{ control gene}] \text{ treated group} - [CT \text{ of the target gene} - CT \text{ control gene}] \text{ control group untreated}$. The control gene GAPDH was used [15].

STATISTICAL ANALYSIS.

All data were presented as mean \pm SEM and $P < 0.05$ was considered statistically significant in all cases. Data analysis was performed by Student's t-test and the GraphPad Prism 5 Demo software.

RESULTS.

Time evolution of body weight and blood glucose.

To determine the health status of the animals in this study, we conducted the weight measurement (Fig 1-A.) and as well as blood glucose (Fig.1-B) of animals for the following dates: D0 before injection and D3, D7, D14 and D21 after injection of alloxan monohydrate (150 mg / kg). All drugs were administered subcutaneously.(figure 1)

The body weights of rats treated with alloxan monohydrate (150 mg / kg) showed significantly lower levels (91 g to 110 g; n = 25) compared to rats treated with saline solution (145 g to 192 g, n = 15) at 14th day after the injection of alloxan monohydrate (Figure 1-A). Rats treated with alloxan monohydrate (150 mg / kg) showed significantly higher blood glucose levels (217-543 mg / dl; n = 25) compared to the rats treated with 0.9% saline solution (89-96 mg / dl; n = 15) after the third day of injection of alloxan monohydrate (Figure 1-B). Analysis of these data showed a statistically significant difference between the two groups, ** $P < 0.002$ for body weight (from 14th day). *** $P < 0.0001$ for glucose (from third day). These observations indicate that there is a body weight drop from 14th day and diabetes appears from third day [16].

Behavioral study.

To determine the presence and the date of onset of mechanical allodynia and hyperalgesia induced by alloxan monohydrate (150 mg / kg), we used the Von Frey filaments test and the Randall-Selitto test in the control group (CG) and group under alloxan monohydrate (GE) at different times.(figure 2).

Statistical analysis between control group of 0.9% saline solution and group of alloxan monohydrate (150 mg / kg) showed a statistically significant difference, ** $p < 0.005$, n = 15 , from 14th day for mechanical allodynia (Fig .2-A) and ** $p < 0.007$, n = 15, for mechanical hyperalgesia from 21st day (Fig.2 B). These results confirm the presence of mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia. In addition, these data also demonstrate that the mechanical allodynia appears first with respect to the mechanical hyperalgesia.

Hyperglycemia causes the neuron activation in the dorsal horn of the spinal cord.

We therefore analyzed neuronal responsiveness of the spinal cord in rats allodynic and hyperalgesic using molecular biological methods. Since nociceptive responses evaluated above mainly reflect the behavioral aspect of the nerve damage. Therefore we explored whether the injection of alloxan monohydrate (150 m / kg) by subcutaneous route may have molecular effects on neurons in particular centrally to the dorsal horn of the spinal cord. With Western blot and quantitative RT-PCR, we have expressed the c-Fos, which is a marker of neuronal activation [17]. (figure 3).

These results suggest that hyperglycemia induced by alloxan monohydrate causes nerve damage materialized at the molecular level by the activation of neurons in the dorsal horn of the spinal cord.

DISCUSSION.

In this study, we evaluated the animal model of neuropathic pain induced by alloxan subcutaneously. We noted a significant reduction in the weight of the animals from 21st day. Our data showed hyperglycemia from the 3rd day after the injection of alloxan monohydrate by subcutaneously. We also determined in rats, mechanical allodynia from the 14th day, and mechanical hyperalgesia from 21st day. Finally, we demonstrated that mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia causes molecular changes in the expression of c-Fos mRNA which is a neuronal activation marker.

Our data showed a fall in body weight in Wistar rats which made them diabetic by a single injection of alloxan by subcutaneously. These results confirm those of the literature that reports

that the injection of streptozotocin intra peritoneal causes a drop weight [18]. This weight regression may be due to lipolytic actions exerted by glucocorticoids in adipose tissue [19]. We also observed that the drop of body weight is associated with hyperglycemia from the third day after injection of alloxan monohydrate by subcutaneously [Auberval and al. 2009]. This hyperglycemia is related to destruction of islets of Langerherans. Our data showed that hyperglycemia appears more quickly compared with the results of some authors [20:21]. Although subcutaneously appears slow compared to intra-peritoneal route, however, the substance used diffuses more easily in adipose tissue and most easily destroyed pancreatic [22]. It must be remembered in this study, the problem of the interpretation of the pain and the issue of pain assessment is thus asked. During surgery, it is convenient, first assessment compared with similar situations in humans. This could not really be realistic if the pain was felt in the same way in every individual, human or animal. It is known that the neurological mechanisms of transmission of nociceptive stimuli are similar in humans and other mammals. It is also known that the necessary stimuli to trigger these mechanisms are very similar. However, it is unable to understand the perception of pain in animals: one cannot determine whether an animal feels a noxious stimulus in the same way and with the same intensity as human. However, we cannot do without the tests based on the paw withdrawal to determine mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia [23].

In our study, we demonstrated that mechanical allodynia appears at 14th and mechanical hyperalgesia at 21st day after the injection of alloxan monohydrate. Indeed, several studies have reported that mechanical Allodynia and mechanical hyperalgesia appears slower in induction methods in Streptozotocin diabetes by intraperitoneal route and genetic method [24]. Indeed, mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia appear 4-5 weeks after injection of Streptozotocin according to the authors [25;26]. Our results contrast with previous studies that these substances were injected by the intraperitoneal route. In addition, the mechanism of allodynia in diabetes is associated with hyperglycemia [27]. The mechanism underlying the action of glucose on the neuron is known. It uses two channels, one of the non-enzymatic glycation and the glucose oxidation [28]. These arguments show that injection subcutaneously could have a faster action on adipose tissue.

We also demonstrated that hyperglycemia causes neuronal damage. Indeed, hyperglycemia would cause oxidative stress in animals, causing nerve damage [29]. In addition, hyperglycemia itself could change the homeostasis of cells of the central nervous system [30]. These studies confirm previous studies by the significant expression of c-Fos. However, none of these hypotheses may explain first the appearance of mechanical allodynia compared with mechanical hyperalgesia as in most studies of neuropathic pain induced pat toxic substances or genetically modified.

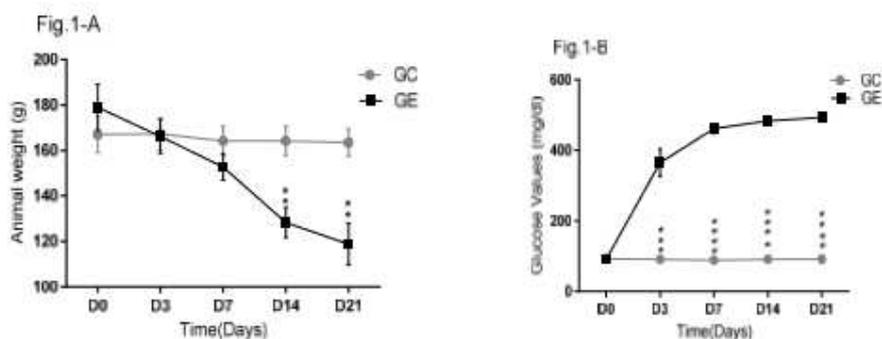


Fig.1: Time evolution of body weight and blood glucose in Wistar rats.

GC: control group (N = 15) and GE: group under alloxan monohydrate (150 mg / kg) (N = 25). The analysis of these data showed a drop in weight between the control group rats under 0.9% saline solution (GC) and group under alloxan monohydrate (GE) (150 mg / kg), ** p <0.002, n =

40 (Fig.1-A). It was also noted hyperglycemia between two aforementioned groups, *** $p < 0.0001$, $n = 40$ (Fig.1 B).

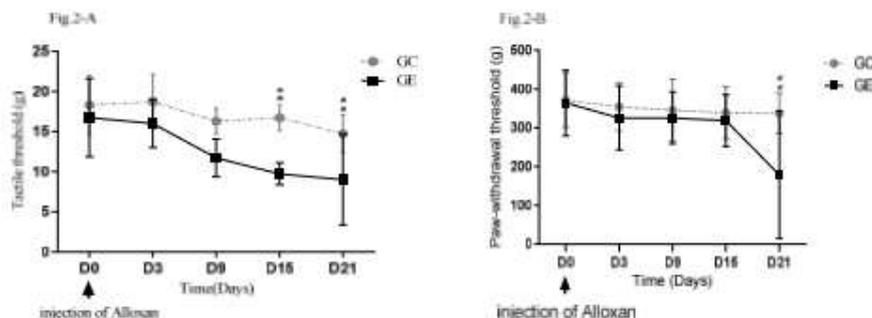


Fig.2: Determination of allodynia and mechanical hyperalgesia.

GC: control group (N = 15) and GE: group under alloxan monohydrate (150 mg / kg) (N = 25). The data of this figure showed mechanical allodynia from 14th day (** $p < 0.005$) (Fig.2-A) and mechanical hyperalgesia from 21st day (** $p < 0.007$) (Fig. 2-B).

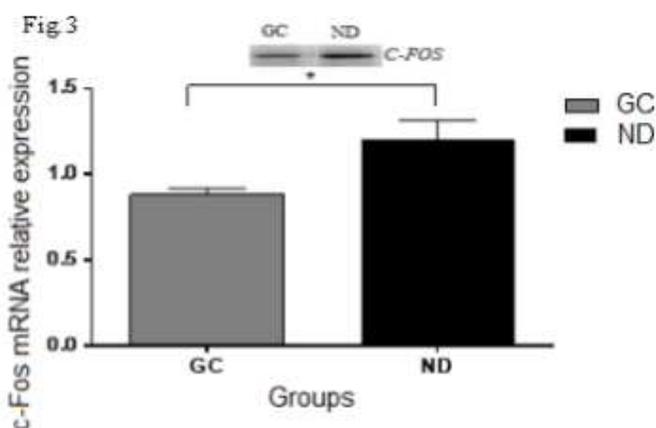


Fig. 3: c-Fos expression in rats.

Analysis of mRNA expression in the rats allodynic and hyperalgesic showed a significant difference between control group (GC) under 0.9% saline solution and the group under alloxan monohydrate (150 mg / kg) * $P < 0.02$, $n = 5$.

CONCLUSION

Definitely, this study allowed us to determine the presence of mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia within a reasonable time by the injection of alloxan monohydrate by subcutaneously. The emergence of these parameters is correlated with an increase of hyperglycemia in Wistar rats.

ACKNOWLEDGEMENTS.

We thank Mrs. Judith BANZOUZI LOUMIKOU who administratively and hardly worked for the realization of this project. We also have to say thanks to Professor Mbayang Ndiaye Niang for the supervision of this project.

CONFLICTS OF INTEREST.

There was no conflict of interest in this work.

REFERENCES

- 1- Wei Sun, Bei Miao, Xiu-Chao Wang, Jian-Hong Duan, Xin Ye, Wen-Juan Han, Wen-Ting Wang, Ceng Luo, San-Jue Hu. Gastrodin Inhibits Allodynia and Hyperalgesia in Painful Diabetic Neuropathy Rats by Decreasing Excitability of Nociceptive Primary Sensory Neurons. *PLoS One.* ; 7(6): e39647. (2012).
- 2- Zangiabadi N., Asadi-Shekaari M., Sheibani V. and al.. Date Fruit Extract Is a Neuroprotective Agent in Diabetic Peripheral Neuropathy in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: A Multimodal Analysis. *Oxid Med Cell Longev.* : 976948.(2011).
- 3- Mixcoatl-Zecuatl T, Jolivald CG.. A spinal mechanism of action for duloxetine in a rat model of painful diabetic neuropathy. *Br J Pharmacol.* 164(1):159–169. (2011).
- 4- Lavasani H, Sheikholeslami B, Ardakani YH, Abdollahi M, Hakemi L, Rouini M-R.. Study of the pharmacokinetic changes of Tramadol in diabetic rats. *Daru.* 2013; 21(1): 17.(2013).
- 5- Islam MS. Animal Models of Diabetic Neuropathy: Progress since 1960s. *J Diabetes Res.* 2013; 149452. (2013).
- 6- Yagihashi S., Mizukami H., Sugimoto K. .Mechanism of diabetic neuropathy: Where are we now and where to go? *Journal of Diabetes Investigation.* volume 2. (2011).
- 7- Javed S, Petropoulos IN, Alam U, Malik RA.. Treatment of painful diabetic neuropathy. *Ther Adv Chronic Dis.* 6(1): 15–28. (2015).
- 8- Rocha-González HI, Ramírez-Aguilar M, Granados-Soto V, Reyes-García JG, Torres-López JE, Huerta-Cruz JC, Navarrete A. Antineuropathic effect of 7-hydroxy-3, 4-dihydrocadalin in streptozotocin-induced diabetic rodents. *BMC Complement Altern Med.* 14: 129. (2014).
- 9- Zimmermann, M. Ethical Guidelines for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals. *Pain* 16:109-110. (1983).
- 10- Randall L.O. Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*111:409–419. (1957).
- 11- Chapman K, Holmes M, Seckl J. 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenases: Intracellular Gatekeepers of Tissue Glucocorticoid Action. *Physiol Rev.* 93(3): 1139–1206. (2013).
- 12- Flatters SJ, Bennett GJ. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain.* 109(1-2):150-61. (2004).
- 13- Stöhr T , Krause E, Selve N. Lacosamide displays potent antinociceptive effects in animal models for inflammatory pain. *Eur J Pain.*10 (3):241-9.(2006).
- 14- Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain.* 50(3):355-63. (1992).
- 15- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 25:402–8. (2001).
- 16- Xu GY, Li G, Liu N, Huang LY. Mechanisms underlying purinergic P2X3 receptor-mediated mechanical allodynia induced in diabetic rats. *Mol Pain.* 7:60. 2011.
- 17- Vincent AM, Kato K, McLean LL, Soules ME, Feldman EL. Sensory Neurons and Schwann Cells Respond to Oxidative Stress by Increasing Antioxidant Defense Mechanisms. *Antioxid Redox Signal* 11(3): 425–438. (2009).
- 18- Medina-Sanchez M., Barneo-Serra L., Menendez-Paez A., and Martinez-Esteban M. Effect of streptozotocin induced diabetes and islet Transplantation in proximal skeletal muscle and histochemical and morphometric analysis. *J. Lab. Clin. Med.*, 123, 921-929. (1994).
- 19- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, and al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods.*10:55–63. .(1994)
- 20- Sun W, Miao B, Wang X-C, Duan J-H, Ye X, Han W-J, Wang W-T, Luo C, Hu S-J. Gastrodin Inhibits Allodynia and Hyperalgesia in Painful Diabetic Neuropathy Rats by Decreasing Excitability of Nociceptive Primary Sensory Neurons. *PLoS One.* 7(6): e39647. (2012).
- 21- Oyenihi AB, Ayeleso AO, Mukwevho E, Masola B. Antioxidant Strategies in the Management of Diabetic Neuropathy. *Biomed Res Int.*2015: 515042.(2015).
- 22- Breen A, Mc Redmond G, Dockery P, O'Brien T, Pandit A. (2008). Assessment of wound healing in the alloxan-induced diabetic rabbit ear model. *J Invest Surg.*21(5):261-9.(2008)

- 23- Mohammadi S, Christie MJ. $\alpha 9$ -nicotinic acetylcholine receptors contribute to the maintenance of chronic mechanical hyperalgesia, but not thermal or mechanical allodynia. *Mol Pain*. 2014; 10: 64. (2014).
- 24- Sima, A. A. F. new insights into the metabolic and molecular basis for diabetic neuropathy. *Cell. Mol. Life Sci.*, 60, 1-20. (2003a).
- 25- Kennedy JM, Zochodne DW. Experimental diabetic neuropathy with spontaneous recovery: is there irreparable damage? *Diabetes*. 2005 Mar; 54(3):830-7. (2005).
- 26- Jack MM, Ryals JM, Wright DE. Protection from diabetes-induced peripheral sensory neuropathy--a role for elevated glyoxalase I? *Exp Neurol.*; 234(1):62-9. (2012).
- 27- Chalmers TM. Nervous and Hormonal Control of Adipose Tissue *Postgrad Med J*. 40(466): 464-469. (1964).
- 28- Routh VH. Glucose Sensing Neurons in the Ventromedial Hypothalamus. *Sensors (Basel)* 2010; 10(10): 9002-9025.(2010).
- 29- Vinik AI, Casellini CM Guidelines in the management of diabetic nerve pain: clinical utility of pregabalin. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2013; 6: 57-78. (2013).
- 30- German JP, Thaler JP, Wisse BE, Oh-I S, Sarruf DA, Matsen ME, Fischer JD, Taborsky GJ, Jr, Schwartz MW, Morton GJ. Leptin Activates a Novel CNS Mechanism for Insulin-Independent Normalization of Severe Diabetic Hyperglycemia. *Endocrinology*. 152(2): 394-404.(2011).

Article 2 : Atténuation de l'allodynie et de l'hyperalgésie par les extraits de feuilles de *Clerodendrum formicarum* dans un modèle de rat de douleur neuropathique diabétique.

La douleur neuropathique diabétique est la complication la plus fréquente et invalidante du diabète et dont l'allodynie et l'hyperalgésie mécanique sont fréquemment présente. L'hyperglycémie joue manifestement un rôle clé dans le développement et la progression de la neuropathie diabétique. Les approches thérapeutiques actuelles ne sont pas satisfaisantes à cause de nombreux effets indésirables. Certains produits naturels offrant des propriétés anti-nociceptives peuvent contribuer d'une manière intégrative au traitement. L'objectif de ce travail était d'évaluer les effets de *Clerodendrum formicarum* sur l'allodynie et l'hyperalgésie mécanique.

Après avoir caractérisé le modèle animal de douleur neuropathique diabétique induite par l'alloxane monohydrate en sous-cutanée, nous nous sommes intéressés à évaluer les effets des extraits de feuilles de *Clerodendrum formicarum* sur l'allodynie et l'hyperalgésie mécanique. Pour ce faire, nous avons utilisé le test de filaments de Von Frey et le test de pression sur la patte respectivement pour évaluer l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie mécanique.

L'administration par voie sous-cutanée (sc) des extraits de feuilles de *Clerodendrum formicarum* (100, 150 et 200 mg / kg) a atténué l'hyperalgésie et l'allodynie mécanique de manière dépendante de la dose chez les rats neuropathiques diabétiques douloureux. L'effet anti-allodynique et anti-hyperalgésique de *Clerodendrum formicarum* était similaire à celui de la prégabaline (10 mg / kg) qui était le traitement classique utilisé dans cette étude.

En conclusion, les extraits de feuilles de *Clerodendrum formicarum* pourraient être une alternative possible à l'atténuation de la douleur par l'atténuation de l'allodynie mécanique et de l'hyperalgésie mécanique.

**Attenuation of Allodynia and Hyperalgesia by the Leaf Extracts
of Clerodendrum Formicarum in Rat Model of Diabetic
Neuropathic Pain**

Loubano-Voumbi G., Diaw M., Ouedraogo V., Sow A. K., Seck A., Boumba L. M. A.,
Ba A. and Samb A.

J Phys Pharm Adv 2015, 5(6): 658-666

DOI: 10.5455/jppa.20150623092121



Online version is available on: www.grjournals.com

Attenuation of Allodynia and Hyperalgesia by the Leaf Extracts of *Clerodendrum Formicarum* in Rat Model of Diabetic Neuropathic Pain

*¹Loubano-Voumbi G., ¹Diaw M., ¹Ouedraogo V., ¹Sow A. K., ¹Seck A., ²Boumba L. M. A., ¹Ba A. and ¹Samb A.

¹Laboratory of Physiology and Functional Exploration, Cheikh Anta Diop University of Dakar, Faculty of Medicine, of Pharmacy and Odontology, Dakar-Senegal.

²Laboratory of Molecular Biology of the Loandjili Hospital, Pointe-Noire-Republic of Congo.

Abstract

Painful neuropathy is the most common and debilitating complication of diabetes and results in allodynia and hyperalgesia. Hyperglycemia clearly plays a key role in the development and progression of diabetic neuropathy. Current therapeutic approaches are only partially successful and they are only thought to reduce the pain associated with peripheral neuropathy. The effective therapeutic management of this disease is pharmacological. However, the use of these drugs is limited by numerous adverse and side effects. Some natural products offer antinociceptive properties that may help to treat in a more integrative manner this disease. The objective of this study was to evaluate the effects of *Clerodendrum formicarum* on allodynia and hyperalgesia. Rats were injected with 150 mg/kg Alloxan monohydrate, to produce hyperglycemia. The Von Frey filaments test and the pressure test on paw were used to assess activity of *Clerodendrum formicarum* extracts. After induction of diabetes, mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia was observed in rats. Administration by subcutaneous (sc) leaves extracts *Clerodendrum formicarum* (100, 150 and 200 mg / kg) attenuated the mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia in a dose-dependent manner in diabetic rats. The anti-allodynic and anti-hyperalgesic of *Clerodendrum formicarum* was similar to that produced by pregabalin (10mg / kg, sc). These results suggest that an alternative is possible in the therapeutic management of painful diabetic neuropathy.

Keywords: *Clerodendrum formicarum*, allodynia, hyperalgesia, neuropathic pain, diabetes.

* Corresponding author: Laboratory of Physiology and Functional Exploration, Cheikh Anta Diop University of Dakar, Faculty of Medicine, of Pharmacy and Odontology, Dakar-Senegal.

Received on: 27 May 2015

Revised on: 05 June 2015

Accepted on: 23 June 2015

Online Published on: 30 June 2015

658 J. Phys. Pharm. Adv., 2015, 5(6): 658-666

Introduction

Chronic neuropathic pain is common worldwide, affecting 7% to 10% of the general population [Van *et al.*, 2014]. It is associated with depression, anxiety and sleep disturbances, and patients with chronic neuropathic pain experience lower health-related quality of life than the general population [Doth *et al.*, 2010; Mulla *et al.*, 2014].

Diabetic neuropathy (DN) seems to be the most common and least understood complication being present in over 50% of chronic diabetics [Callaghan *et al.*, 2012, Kasznicki *et al.*, 2012]. It can be found late in type 1 diabetes but early in type 2 diabetes and the cause of this occurrence is still not clear [Shaikh and Somani, 2010]. Increased free-radical formation and/or a defect in antioxidant defenses which result in oxidative stress have been implicated in the pathogenesis of diabetic neuropathy [Ziegler *et al.*, 2005]. Diabetic neuropathies are heterogeneous and affect different parts of the nervous system with various clinical manifestations [Boulton *et al.*, 2005].

The effective therapeutic management of painful diabetic neuropathy is pharmacological. Several drugs including antidepressants, anticonvulsants, opioids and conventional analgesics are used to fight against this disease; however, many unwanted side effects limit their use. In developing countries, plants having an analgesic activity could constitute an alternative therapeutic of the painful diabetic neuropathy due to their better accessibility and their lower toxicity in general, compared to conventional drugs.

Long used in traditional African medicine to relieve many illnesses and symptoms including fever, headaches, epilepsy and chronic pain, *Clerodendrum formicarum* grows as a shrub pubescent, brown and streaked. It grows in forests and fallow recruits of tropical Africa. The phytochemical composition consists essentially of the two new salicylic acid derivatives named formoic acids A and B along with four other known constituents named: flemingipanique acid, verbascoside acid, martynoside acid and potassium seguinoside acid [Ali *et al.*, 2010a; Ali *et al.*, 2010b]. Although its action as antioxidant is known,

however their therapeutic potential of *Clerodendrum formicarum* extracts (ECF) remains to be elucidated.

In this present study, our objective was to evaluate the effects of leaves extracts of *Clerodendrum formicarum* (ECF) on allodynia and hyperalgesia in an animal model of painful diabetic neuropathy induced by alloxan monohydrate.

Materials and Methods

Plant Material

Leaves of *Clerodendrum formicarum* (ECF) were collected at the Department of Sangha (Republic of Congo) geographical coordinates 2° 05' North and 14° 08' East. These leaves have been identified by the botanical specialist Dr Pierre Mangala. The specimens #12344, deposited at the IRD of Brazzaville.

Preparation of Plant Extract

Leaves were dried in an oven at 45°C with air circulation for three days. The leaves were macerated and the powder (500g) was subjected to extraction with 1L of 95% Ethanol three times at room temperature. The time of each extraction was 72 h. The extractive solution was concentrated under vacuum in a rotavapor to yield 20 g of the crude extract. This crude extract was used for the antinociceptive activity [Ali *et al.*, 2010a; Tausseef *et al.*, 2013].

Animals

The Wistar strain male rats (125-280 g, n = 50, Laboratory of Physiology and Functional Exploration, Cheikh Anta Diop University of Dakar) were used in all experiments. The animals were housed in collective cages in groups of 4 or 5 and have enjoyed a day / night cycle of 12 hours, with a temperature of 24 ± 2 °C as well as food and water ad libitum. All experimental protocols were approved by the Ethics Committee of the Cheikh Anta Diop University of Dakar and the Ethical Guidelines of the International Association for the Study of Pain have been met [Zimmermann].

Induction of Diabetes and Medication Administration

Experimental diabetes was induced in rats by a single injection of 150 mg/kg of alloxan monohydrate (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) by subcutaneous (sc) in rats (GA). The animals, divided into groups of five rats were isolated for 18 hours before experimentation. Behavioral testing described below was applied to each rat before and during the experiment. Initially, rats were injected with 0.5 ml of the 0.9% saline solution (control) (GC, n = 10) of alloxan monohydrate (150 mg/kg) (GA, n = 40). Then, painful neuropathic diabetic rats divided in 5 groups; Those of the group receiving the leaf extracts of *Clerodendrum formicarum* (ECF) at a dose of 100 mg/kg, 150 mg/kg and 200 mg/kg, a standard group (Preg.) receiving of a Pregabalin (10 mg/kg) and the painful neuropathic rats group under 0.9% saline (ND-S). All drugs were injected subcutaneously.

Blood Glucose Measurement

The Blood glucose measurement was performed by Accu-Chek Active Player (Roche Diagnostics GmbH, Germany) for the quantitative determination using fresh capillary blood. Values above 300 mg/dl were considered hyperglycemia [Sun *et al.*, 2012].

Behavioral Study

Two tests have spent to the behavioral study, the Von Frey filaments test to assess mechanical allodynia, testing of Randall and Selitto pressure test to assess mechanical hyperalgesia.

Von Frey Filaments Test

Mechanical allodynia technique based on the gradual application of Von Frey filaments weighing from 0.16 to 26 g on the plantar surface of the hind legs of the animals. The rats were placed in a plexiglass cage and were acclimated for 20 minutes before testing. Painful diabetic neuropathy in rats was materialized by a withdrawal movement or described in terms of the paw. In ascending order of force, each filament was applied to the mid-plantar area of each hind paw five times, with each application being held for 5 s. Withdrawal responses to the von Frey filaments from both hind paws were counted and then expressed as an overall percentage response, i.e. if a rat withdrew 6 times

out of a total 10 Von Frey applications, this was recorded as 60% overall response to that Von Frey filament [Flatters and Bennett, 2004].

Mechanical Hyperalgesia Using Randall-Selitto

Mechanical hyperalgesia was measured using the Randall-Selitto paw pressure test (algesimeter Ugo Basile, 92370 Chaville) as described [Stöhr *et al.*, 2010]. Briefly, the rat's hind paw was placed into the pressure applicator, and a steadily increasing pressure stimulus (maximum cut-off of 250 g) was applied to the dorsal surface of the paw until withdrawal or vocalization. This was recorded as the nociceptive threshold value. For each animal, two recordings were made for each hind paw, and the data were reported as the mean of both hind paw values [Bang *et al.*, 2010].

Statistical Analysis

All data are presented as mean \pm S.E.M. The time-course curves were subjected to two-way repeated measures analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's *post hoc* test. Total nociceptive score for each treatment was calculated in an arbitrary unit as the area under the curve (AUC). Differences in AUCs were analyzed using one-way ANOVA, with drug treatment as a between-subjects factor, followed by the Newman-Keuls test. GraphPad Prism for Windows, Version 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used for all statistical analyses and ED50 determinations. $P < 0.05$ was considered statistically significant in all analyses.

Results

Development of Hyperglycemia

It is established that diabetes can cause neuropathy pain [Callaghan *et al.*, 2012]. To determine diabetes, 150 mg/kg of alloxan monohydrate was injected in rats of the group (GA) (n=40) by the subcutaneous route. We noted that the rats developed a hyperglycemia from the 3rd day after the injection of alloxan monohydrate. In contrast, the rats of the control group (CG) (n = 10) received of 0.9% saline maintained normal blood glucose levels (89-96 mg/dl; n = 10). Analysis of

our data showed a statistically significant difference between two groups, *** P <0.0001 at 3rd day.

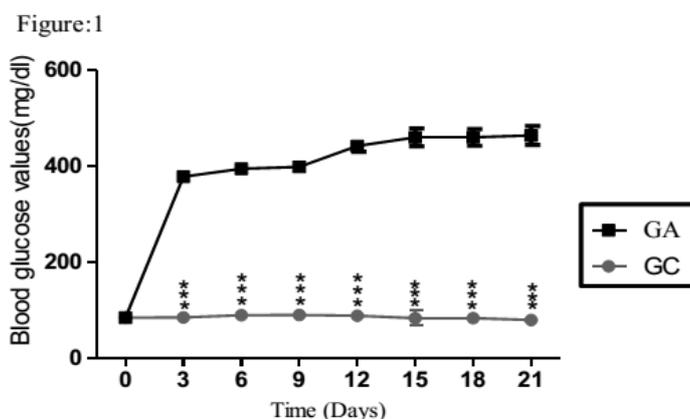


Fig. 1: Time evolution of glycemia. GC: group of normal rats in 0.9% saline; GA: group of normal rats under alloxan monohydrate at 150 mg/kg. All results are shown with \pm SEM and $p < 0.05$ was considered positive. *** $p < 0.0001$, $n=10$ for the group (GC) and $n=40$ for the group (GA) at 3rd day.

Development of Mechanical Allodynia and Mechanical Hyperalgesia

The injection of alloxan monohydrate (150 mg/kg) in rats induced hyperglycemia after 3 days. Behavioral tests every 3 days in diabetic rats by the Von Frey filament test and the pressure test on the paw were used to determine mechanical allodynia

from the 15th day after injection of the chemical, ** $p < 0.001$ (Figure 2A). The mechanical hyperalgesia was observed from 21st day after the injection of alloxan monohydrate, ** $p < 0.004$ (Figure 2B). These results demonstrate that diabetes causes the appearance of mechanical allodynia and hyperalgesia.

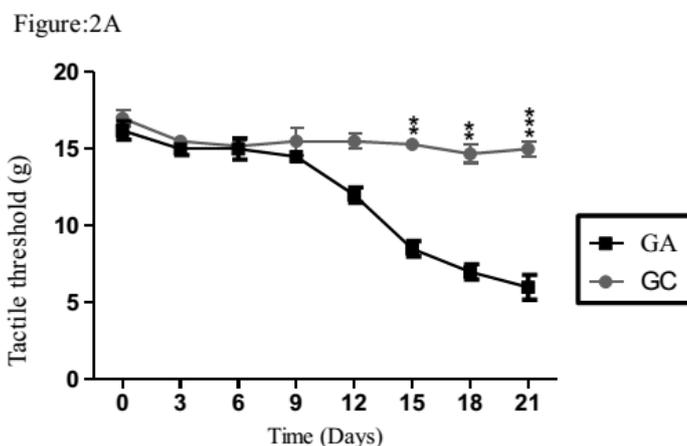


Figure:2B

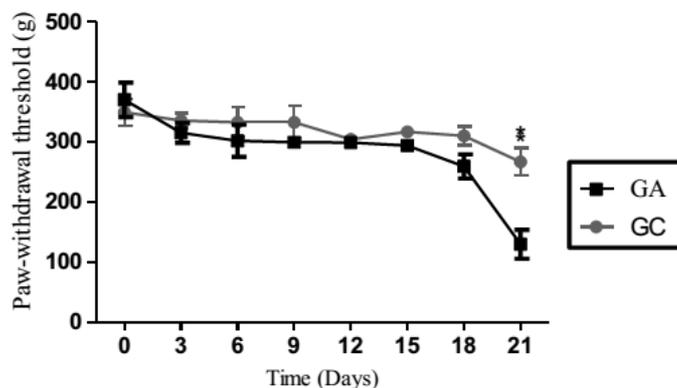


Fig. 2: Time evolution of the occurrence of mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia. GC: group of normal rats in 0.9% saline; GA: group of normal rats under alloxan monohydrate at 150 mg / kg. All results are shown with \pm SEM and $p < 0.05$ was considered positive. ** $p < 0.001$, $n = 10$ (Figure 2A) and ** $p < 0.004$, $n = 40$. (Figure 2B).

ECF Attenuates Mechanical Allodynia and Mechanical Hyperalgesia

To investigate the effect of ECF on diabetic painful neuropathy, we performed experiments in which ECF was subcutaneous (S.C.) administered a single dose of ECF after the determination of mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia. As shown in Figure 3, administration of ECF significantly attenuated the mechanical allodynia in a dose-dependent manner in diabetic rats. Quantitative analysis showed that ECF increased the mechanical pain threshold to 10.4 ± 0.7 , 12.8 ± 0.8 g and 14.4 ± 1.1 g at doses of 100, 150 and 200 mg/kg body weight, respectively, compared to the Standard group (PRE) 15.2 ± 0.8 g at 2 hr after of the administration of ECF. (Maximum threshold was

recorded by Von Frey filaments test). (Figure.3A, $P < 0.07$, $n = 5$) and the ED50 is 67.5 mg/kg for ECF (Figure 3B). Similarly, the Alloxan-induced mechanical hyperalgesia was increased by ECF in a dose-dependent manner to 188 ± 24.5 ; 207.4 ± 24.1 g and 309.2 ± 18.8 g by ECF at doses of 100, 150 and 200 g body weight, respectively, compared to the Standard (311.1 ± 28.8 g) at 2 hr after the administration of the treatment (maximum threshold was recorded by pressure test on the paw). There was no significant difference between the group ECF (200 mg/kg) with the positive control group (Preg), $p < 0.3$, $n = 5$. (Figure 3C) and the ED50 is 84 mg/kg for ECF (Figure 3D). These results show that ECF attenuates mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia dose-dependent.

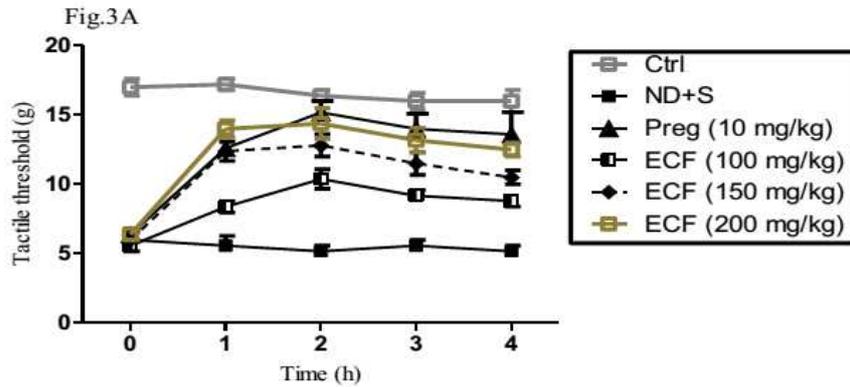


Fig. 3A: shows the effect of ECF on mechanical allodynia.

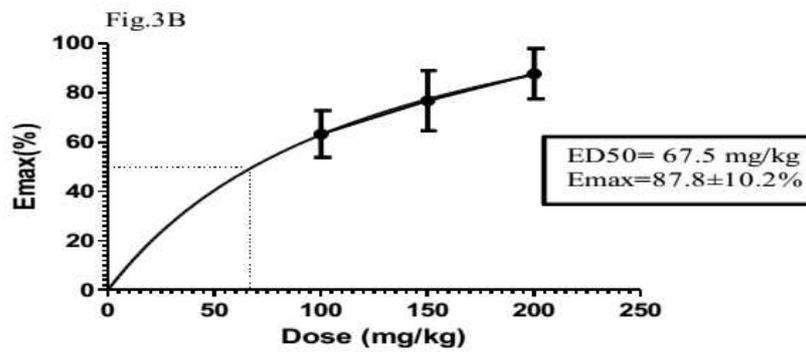


Fig. 3B: represents the effective dose (mechanical allodynia).

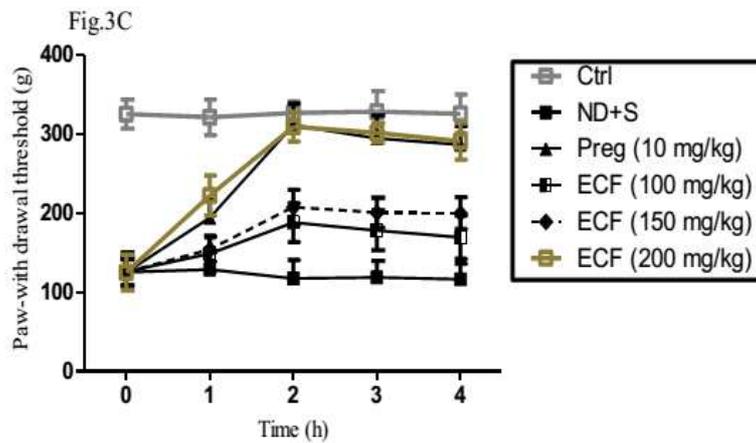


Fig. 3C: represents the ECF effect on mechanical hyperalgesia.

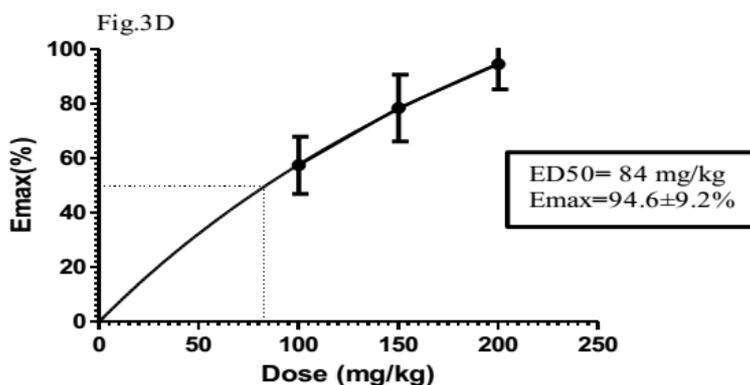


Fig. 3: Effect of *Clerodendrum formicarum* on the mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia.

Fig.3D represents the effective dose (mechanical hyperalgesia). Compared to the results found with the standard group (Preg.) (10 mg / kg), there was no significant difference with the dose-dependent ECF Group. The maximum threshold was noted with a dose of 200 mg/kg of ECF. $P < 0.07$ for the mechanical allodynia and $p < 0.3$ for mechanical hyperalgesia. $N=5$. All results are represented in \pm S.E.M.

Discussion

The Current study was performed to determine the therapeutic potential of *Clerodendrum formicarum* in the treatment of Alloxan-induced painful peripheral neuropathy in rats. In our study, we noted the hyperglycemia after the third day administration of Alloxan. Mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia respectively appear the 15th and the 21st day after injection of alloxan in the rats. In addition, this drug showed antiallodynic activity and anti-hyperalgesic activity in the Alloxan-induced model. In both tests, the antineuropathic effect was equieffective to pregabalin, a drug of first line in the treatment of neuropathic pain [Dworkin *et al.*, 2010; Vranken, 2010]. In contrast with the doses used in other drugs, the antiallodynic activity and the anti-hyperalgesic activity was observed in rat with doses of 10 times greater. Differences could be attributed to the specie used since it is well known that hepatic metabolism of rat is more accelerated than human [Oxenkrug, 2013]. To the best of our knowledge, this is the first report about the antiallodynic activity and the antihyperalgesic activity of ECF.

In this study, we first described that the induction of diabetic neuropathic pain by

subcutaneous had the same characteristics as by the intraperitoneal route. Indeed, most animal models described in the literature for the study of diabetic neuropathy uses intra-peritoneally whose chemical substance is injected in several days in most cases and infrequent a single injection. Our results are compared with studies using alloxan or streptozotocin intra-peritoneally [Shahidul, 2013; Rocha-González *et al.*, 2014]. It was noted an onset of diabetes from the 3rd day after the injection. These data may suggest that alloxan monohydrate used in our study thus diffuse easily in adipose tissue. The sensitivity of diabetic rats with hyperglycemia to mechanical and thermal stimuli was tested wherein 80% of rats with hyperglycemia developed mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia. This pain hypersensitivity started on the 15th day after Alloxan and remained throughout the entire testing phase. Indeed, mechanical allodynia appeared on the 15th day and 21st day hyperalgesia after injection of alloxan monohydrate. However, interpretation of behavior testing to evaluate these parameters has long been the subject of several criticisms. However, these testes remain valid and we can determine allodynia and hyperalgesia. [Edwards *et al.*, 2008; Islam, 2013, O'Brien *et al.*, 2014]. These results are consistent

with previous reports and indicate that the Alloxan-induced diabetic animal model successfully simulates the pathophysiology of PDN [Fox *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2004; Fuchs *et al.*, 2010].

In this study we evaluate the effect of ECF on mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia. One of the most striking findings of the present study is that intraperitoneal injection of ECF, a main constituent of the traditional Tropical African herb (*Clerodendrum formicarum*) effectively attenuated the allodynia and hyperalgesia associated with diabetic neuropathy. The mechanism of the antinociceptive effect of ECF in neuropathic diabetic rats is unknown. Historically, ECF has long been used in traditional medicine in Central Africa of peoples to treat many diseases including chronic pain, headache, rheumatism and epilepsy. Recently, a study determined some of its phytochemical composition consisting essentially derived salicylic acid [Ali *et al.*, 2010]. In Addition, a second study also determined its therapeutic potential as an antioxidant. [Tauseef *et al.*, 2013]. Its mechanism of action and its antinociceptive effect could be related to derivatives of salicylates which are known as one of the inhibitors of cyclooxygenase pathway. [Cardario and McKinnon, 1991; Nguyen and Chaiton, 2001]. Although pregabalin is clinically considered as the gold standard for the treatment of painful diabetic neuropathy in human beings [Bril *et al.*, 2011], its use is limited due to side effects such as sedation, dizziness and somnolence that affects motor coordination [Blommel and Blommel, 2007; Ifuku *et al.*, 2011]. For this reason, the doses of ECF and pregabalin were compared in the behavioral test. Interestingly, the results obtained enter the two drugs are almost similar. Our results seem to point out that notwithstanding the similar anti-allodynic and anti-hyperalgesic activity between both drugs, ECF might present an advantage on pregabalin in the painful diabetic neuropathy treatment because of numerous side effects that are observed in the treatment of neuropathic pain [Blommel and Blommel, 2007].

Acknowledgements

We thank Mrs. Judith Banzouzi Loumikou who administratively and hardly worked for the realization of this project. We also have to say thanks to Professor Mbayang Ndiaye Niang for the supervision of this project.

References

- Ali MS, Ahmed Z, Ali MI, Ngoupayo J (2010a). Formadienoate A and B: Two new long chained feruloyl esters from *Clerodendrum formicarum* Gürke (Lamiaceae) of Cameroon. *Nat. Prod. Commun.*, 5(6): 919-922.
- Ali MS, Ahmed Z, Ngoupayo J, Ali MI (1995b). Terpenoids from *Clerodendrum formicarum* Gürke (Lamiaceae) of Cameroon. *Z. Naturforsch.*, (2010a). 65(b): 521-524.
- Bang S, Yoo S, Yang TJ, Cho H, Kim YG, Hwang SW (2010). Resolvin D1 attenuates activation of sensory transient receptor potential channels leading to multiple antinociception. *Br. J. Pharmacol.*, 161(3): 707-720. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.00909.x.
- Blommel ML, Blommel AL (2007). Pregabalin: an antiepileptic agent useful for neuropathic pain. *Am. J. Health Syst. Pharm.*, 64(14): 1475-82.
- Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, Malik RA, Maser RE, Sosenko JM, Ziegler D (2005). Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care.*, 28(4): 956-62.
- Bril V, England J, Franklin GM, Backonja M, Cohen J, Del Toro D, Feldman E, Iverson DJ, Perkins B, Russell JW, Zochodne D (2011). Report of the American Academy of Neurology, the American Association of Neuromuscular and Electrodiagnostic Medicine, and the American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation. *American Academy of Neurology, American Association of Neuromuscular and Electrodiagnostic Medicine, Am. Acad. Phys. Med. Rehabil. Neurol.*, 76(20): 1758-65.
- Calcutt NA (2002). Potential mechanisms of neuropathic pain in diabetes. *Int. Rev. Neurobiol.*, 50: 205-28.
- Callaghan BC, Cheng HT, Stables CL, Smith AL, Feldman EL (2012). Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. *Lancet Neurol.*, 11(6): 521-34.
- Cardario B, McKinnon AA (1991). Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs: Monitoring to help prevent serious adverse effects. *An. Fam. Physician.*, 37: 171-180.
- Chen X, Levine JD (2003). Altered temporal pattern of mechanically evoked C-fiber activity in a model of diabetic neuropathy in the rat. *Neurosci.*, 121(4): 1007-15.
- Doth AH, Hansson PT, Jensen MP, Taylor RS (2010). The burden of neuropathic pain: a systematic review and meta-analysis of health utilities. *Pain.*, 149(2): 338-44.
- Dworkin RH, O'Connor AB, Audette J, Baron R, Gourlay GK, Haanpää ML, Kent JL, Krane EJ, Lebel AA, Levy RM, Mackey SC, Mayer J, Miasowski C, Raja SN, Rice AS, **J. Phys. Pharm. Adv.**, 2015, 5(6): 658-666

- Schmader KE, Stacey B, Stanos S, Treede RD, Turk DC, Walco GA, Wells CD (2010). Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. *Mayo Clin. Proc.*, 85(3 Suppl): S3-14.
- Edwards JL, Vincent A, Cheng T, Feldman EL (2008). Diabetic Neuropathy: Mechanisms to Management. *Pharmacol. Ther.*, 120(1): 1-34. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2008.05.005.
- Flatters SJ, Bennett GJ (2004). Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain.*, 109(1-2): 150-61.
- Fox A, Eastwood C, Gentry C, Manning D, Urban L (1999). Critical evaluation of the streptozotocin model of painful diabetic neuropathy in the rat. *Pain.*, 81(3): 307-16.
- Fuchs D, Birklein F, Reeh PW, Sauer SK (2010). Sensitized peripheral nociception in experimental diabetes of the rat. *Pain.*, 151(2): 496-505.
- Gutierrez VP, Zambelli VO, Picolo G, Chacur M, Sampaio SC, Brigatte P, Konno K, Cury Y (2012). The peripheral L-arginine-nitric oxide-cyclic GMP pathway and ATP-sensitive K⁺ channels are involved in the antinociceptive effect of krotalphine on neuropathic pain in rats. *Behav. Pharmacol.*, 23(1): 14-24.
- Hong S, Morrow TJ, Paulson PE, Isom LL, Wiley JW (2004). Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in tetrodotoxin-sensitive and -resistant sodium channels in dorsal root ganglion neurons in the rat. *J. Biol. Chem.*, 279(28): 29341-50.
- Ifuku M, Iseki M, Hidaka I, Morita Y, Komatus S, Inada E (2011). Replacement of gabapentin with pregabalin in postherpetic neuralgia therapy. *Pain Med.*, 12(7): 1112-6.
- Islam MS (2013). Animal Models of Diabetic Neuropathy: Progress Since 1960s. *J. Diabetes Res.*, 2013: 149452. DOI: 10.1155/2013/149452.
- Kasznicki J, Kosmalski M, Sliwinska A, Mrowicka M, Stanczyk M, Majsterek I, Drzewoski J (2012). Evaluation of oxidative stress markers in pathogenesis of diabetic neuropathy. *Mol. Biol. Rep.*, 39(9): 8669-78.
- Motulsky HJ, Christopoulos A (2003). A practical guide to curve fitting. San Diego, CA: GraphPad Software Inc; Fitting model to biological data using linear and nonlinear regression.
- Mulla SM, Buckley DN, Moulin DE, Couban R, Izhar Z, Agarwal A, Panju A, Wang L, Makosso Kallyth S, Turan A, Montori VM, Sessler DI, Thabane L, Guyatt GH and Busse JW (2014). Management of chronic neuropathic pain: a protocol for a multiple treatment comparison meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ Open.*, 4(11): e006112. DOI: 10.1136/bmjopen-2014-006112.
- Nguyen A, Chaiton A (2001). Cyclooxygenase (COX-2) selective inhibitors. Any better than NSAIDs? *An. Fam. Phys.*, 47: 1398-1400.
- O'Brien PD, Sakowski SA, Feldman EL (2014). Mouse Models of Diabetic Neuropathy. *ILAR J.*, 54(3): 259-272. DOI: 10.1093/ilar/ilt052.
- Oxenkrug G (2013). Insulin resistance and dysregulation of tryptophan-kynurenine and kynurenine-nicotinamide adenine dinucleotide metabolic pathways. *Mol. Neurobiol.*, 48(2): 294-301. DOI: 10.1007/s12035-013-8497-4.
- Randall LO, Selitto JJ (1957). A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 111: 409-419.
- Rocha-González EI, Ramírez-Aguilar M, Granados-Soto V, Reyes-García JG, Torres-López JE, Huerta-Cruz JC, Navarrete A (2014). Antineuropathic effect of 7-hydroxy-3, 4-dihydrocadalin in streptozotocin-induced diabetic rodents. *BMC Complement Altern. Med.*, 14: 129. DOI: 10.1186/1472-6882-14-129.
- Shaikh AS, Somani RS (2010). Animal models and biomarkers of neuropathy in diabetic rodents. *Indian J. Pharmacol.*, 42(3): 129-34.
- Sun W, Miao B, Wang XC, Duan JH, Ye X, Han WJ, Wang WT, Luo C, Hu SJ (2012). Gastrodin Inhibits Allodynia and Hyperalgesia in Painful Diabetic Neuropathy Rats by Decreasing Excitability of Nociceptive Primary Sensory Neurons. *PLoS One.*, 7(6): e39647. DOI: 10.1371/journal.pone.0039647.
- Tauseef S, Ali MS, Ahmed A, Ali MI, Ahmed Z, Sherwani SK, Ahmed G, Onocha AO, Ngoupayo J, KamdemWaffo AF, Tauseef F (2013). In vitro Antioxidant activity analysis of five medicinally important plants. *J. Phcog. Phytochemistry.*, 2(4): 183-188.
- Van Hecke O, Austin SK, Khan RA, Smith BH, Torrance N (2014). Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. *Pain.*, 155(4): 654-62.
- Vranken JH (2012). Elucidation of pathophysiology and treatment of neuropathic pain. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.*, 12(4): 304-14.
- Ziegler D, Sohr CG, Nourooz-Zadeh J (2004). Oxidative stress and antioxidant defense in relation to the severity of diabetic polyneuropathy and cardiovascular autonomic neuropathy. *Diabetes Care.*, 27(9): 2178-83.
- Zimmermann M (1983). Ethical Guidelines for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals. *Pain.*, 16: 109-110.

Article 3 : Analyse moléculaire des effets de *Clerodendrum formicarum* dans un modèle animal de la douleur neuropathique diabétique chez le rat.

La physiopathologie de la douleur neuropathique diabétique est principalement due à des facteurs métaboliques et vasculaires. Il a été noté une augmentation de sorbitol, de fructose, des produits finaux glyqués, des espèces réactives de l'oxygène et de l'activation de la protéine kinase C dans l'état diabétique. Tous ces facteurs conduisent à des lésions nerveuses. La prise en charge clinique efficace de la douleur neuropathique est basée sur un traitement pharmacologique qui a montré leurs limites et de nombreux effets secondaires. L'hypothèse de la sensibilisation centrale inhibée par *Clerodendrum formicarum* par un mécanisme qui peut concerner les cellules gliales et certaines voies de signalisation notamment celle de la cyclooxygénase. L'objectif de ce travail était d'étudier les effets de *Clerodendrum formicarum* sur les astrocytes et les cellules microgliales dans un modèle de la douleur neuropathique diabétique.

Après avoir montré les effets anti-allodyniques et anti hyperalgésiques des extraits de feuilles de *Clerodendrum formicarum* (ECF), nous nous sommes intéressés tout d'abord à évaluer les mécanismes d'action des ECF par l'expression de GFAP et de CD11b respectivement marqueur des astrocytes et des cellules microgliales. Les résultats de ce travail ont montré que les ECF inhibent la surexpression de GFAP et de CD11b chez les rats neuropathiques diabétiques douloureux après 5 jours de traitements de manière dépendante de la dose. Ces données suggèrent que les cellules gliales sont une cible pour les ECF. Ces données confirment également que les cellules gliales sont impliquées dans la genèse de l'allodynie mécanique et de l'hyperalgésie mécanique.

Enfin, nous avons exprimés les deux isoformes de la voie de la cyclooxygénase Cox1 et Cox2 après traitement aux ECF à dose différentes. Les résultats nous ont montré qu'ECF inhibe également les deux isoformes de la voie de cyclooxygénase de manière dépendante de la dose. Ces données confirment l'implication de la voie de signalisation de cyclooxygénase dans la douleur et montrent également que les deux isoformes de la cyclooxygénase est une cible pour les ECF.

En conclusion, ce travail montre que plusieurs cibles cellulaires et moléculaires peuvent être identifiées dans la recherche des nouveaux médicaments moins toxiques et avec moins d'effets indésirables dans le traitement de la douleur neuropathique.

Molecular Analysis of *Clerodendrum formicarum* Effects in Painful Diabetic Neuropathy in Rat

Ghislain Loubano-Voumbi^{1*}, Mor Diaw¹, Valentin Ouedraogo¹, Abdou Khadir Sow¹, Aïssatou Seck¹, Luc Magloire Anicet Boumba², Abdoulaye Ba¹, Abdoulaye Samb¹

¹Laboratory of Physiology and Functional Exploration, Faculty of Medicine of Pharmacy and Odontology, Cheikh Anta Diop University of Dakar, Dakar, Senegal

²Laboratory of Molecular Biology of the Loandjili Hospital Pointe, Noire, Republic of Congo
Email: ghisloubano@yahoo.fr

Received 2 June 2015; accepted 24 July 2015; published 27 July 2015

Copyright © 2015 by authors and Scientific Research Publishing Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

The pathophysiology of diabetic neuropathic pain is due to primarily metabolic and vascular factors. There is an increase in sorbitol and fructose, glycated end products, reactive oxygen species and activation of protein kinase C in the diabetic state. All these factors lead to direct damage to the nerves. Taking effective clinical management of neuropathic pain is based on a pharmacological treatment that has shown their limits and many side effects. The hypothesis of central sensitization inhibited by *Clerodendrum formicarum*, an African pharmacopoeia plant used to treat headaches, arthritis, epilepsy and chronic pain could act on astrocytes and microglial cells. The objective of this work is to study the effect of *Clerodendrum formicarum* (100, 150 and 200 mg/kg body weight) on astrocytes and microglial cells in a model of diabetic neuropathic pain induced by alloxan monohydrate (150 mg/kg). We noted a suppression of mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia respectively by the Von Frey filaments test and the pressure test on the paw by the *Clerodendrum formicarum* extracts (ECF) at different doses from 2 h at the first injection of the ECF. After 5 days of treatment, we expressed by Western Blot bands of different proteins and by quantitative RT-PCR, we determined inhibition of the expression of GFAP, CD11b and isoforms 1 and 2 of cyclooxygenase. These results suggest that ECF inhibits the activation of astrocytes, microglial cells and cyclooxygenase signaling pathway.

Keywords

Clerodendrum formicarum, Astrocytes, Microglial Cells, Diabetic Neuropathy Pain, Cyclooxygenase

*Corresponding author.

How to cite this paper: Loubano-Voumbi, G., Diaw, M., Ouedraogo, V., Sow, A.K., Seck, A., Boumba, L.M.A., Ba, A. and Samb, A. (2015) Molecular Analysis of *Clerodendrum formicarum* Effects in Painful Diabetic Neuropathy in Rat. *World Journal of Neuroscience*, 5, 258-269. <http://dx.doi.org/10.4236/wjns.2015.54023>

1. Introduction

Diabetic neuropathy is pathology of diabetic patient ignored because it is often silent. This is one of the most common chronic complications of diabetes [1]. It can affect the peripheral nervous system and/or autonomous or vegetative nervous system. The prevalence of diabetic neuropathic pain affects approximately more than 50% of diabetics [2] [3]. Factors associated with a higher risk of developing diabetic neuropathic pain included older age, lower socioeconomic status, treatment with insulin, longer duration of diabetes and poor glycaemia control [1] [2].

Taking effective clinical management of neuropathic pain is pharmacological. However, many drugs have many side effects or undesirables, which limit their use for long periods. An alternative is possible, with the use of more and more certain plants used in traditional medicine [4] [5].

The painful diabetic neuropathy can be found late in type 1 diabetes but early in type 2 diabetes and the cause of this occurrence is still not clear [6]. Increased free-radical formation and/or a defect in antioxidant defenses which result in oxidative stress have been implicated in the pathogenesis of diabetic neuropathy [7].

Clerodendrum formicarum is a plant used in tropical Africa for these virtues against chronic pain, headache, rheumatism and epilepsy. The phytochemical composition consists of partly derived salicylic acids, which could justify their analgesic action. To date, the underlying mechanism of action of the analgesic activity was never solved [8]. We will formulate a hypothesis about inhibition of central sensitization including glial cells in the dorsal horn of the spinal cord by the ethanol extracts of *Clerodendrum formicarum* (ECF).

In this present work, our objective is to evaluate the effects of ECF in the treatment of painful diabetic neuropathy by this medication. To achieve this objective, we used two approaches: behavioral and biochemical.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

Leaves of *Clerodendrum formicarum* were collected at the Department of Sangha (Republic of Congo) geographical coordinates 2°05'North and 14°08'East. These leaves have been identified by the botanical specialist Dr Pierre Mangala. The specimens #12344, deposited at the IRD of Brazzaville.

2.2. Preparation of Plant Extract

Leaves were dried in an oven at 45°C with air circulation for three days. The leaves were macerated and the powder (500 g) was subjected to extraction with 1L of 95% Ethanol (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) three times at room temperature. The time of each extraction was 72 h. The extractive solution was concentrated under vacuum in a rotavapor (Büchi Labortechnik AG, Switzerland) to yield 20 g of the crude extract. This crude extract was used for this study [9].

2.3. Animals

The Wistar strain male rats (125 - 280 g, n = 50, Laboratory of Physiology and Functional Exploration, Cheikh Anta Diop University of Dakar) were used in all experiments. The animals were housed in collective cages in groups of 4 or 5 and have enjoyed a day/night cycle of 12 hours, with a temperature of 24°C ± 2°C as well as food and water ad libitum. All experimental protocols were approved by the Ethics Committee of the Cheikh Anta Diop University of Dakar and the Ethical Guidelines of the International Association for the Study of Pain have been met [10].

2.4. Induction of Diabetes and Medication Administration

Experimental diabetes was induced in rats by a single injection of 150 mg/kg of alloxan monohydrate (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) by subcutaneous (sc) in rats (GA). The animals, divided into groups of five rats were isolated for 18 hours before experimentation. Behavioral testing described below was applied to each rat before and during the experiment. Initially, rats were injected with 0.5 ml of the 0.9% saline solution (Normal) (GC, n = 10), of alloxan monohydrate (150 mg/kg) (GA, n = 40). Then, painful neuropathic diabetic rats divided in 5 groups; those of the group receiving the extracts *Clerodendrum formicarum* (ECF) at a dose of 100 mg/kg, 150 mg/kg and 200 mg/kg, a standard group (Preg.) receiving of a Pregabalin (10 mg/kg) (Sigma-Aldrich, St. Louis,

USA) and the painful neuropathic rats group under 0.9% saline [(ND + S) group]. All drugs were injected subcutaneously and doses were determined in comparison to those of the daily dose used in traditional medicine and taking into account the metabolism of high rats than humans [11].

2.5. Determination of General Toxicity

The acute toxicity for 100 mg/kg; 150 mg/kg and 200 mg/kg was determined in Wistar rat, maintained under standard conditions. The animals ($n = 5$) in each group were fasted overnight prior to the experiment. Animals were observed individually for the first four hours after dosing for the presence of any clinical signs, such as changes in skin fur, lacrimation, salivation, piloerection, diarrhea, and mortality. The gross behaviors were observed.

2.6. Blood Glucose Measurement

The Blood glucose measurement was performed by Accu-Chek Active Player (Roche Diagnostics GmbH, Germany) for the quantitative determination using fresh capillary blood. Values above 300 mg/dl were considered hyperglycemia [12].

2.7. Behavioral Study

Two tests have spent to the behavioral study, the Von Frey filaments test to assess mechanical allodynia, testing of Randall and Selitto or pressure test to assess mechanical hyperalgesia.

2.7.1. Von Frey Filaments Test

Mechanical allodynia technique based on the gradual application of Von Frey filaments (Biosep, France) weighing from 0.16 to 26 g on the plantar surface of the hind legs of the animals. The rats were placed in a plexiglass cage and were acclimated for 20 minutes before testing. Painful diabetic neuropathy in rats was materialized by a withdrawal movement or described in terms of the paw. In ascending order of force, each filament was applied to the mid-plantar area of each hind paw five times, with each application being held for 5 s. Withdrawal responses to the Von Frey filaments from both hind paws were counted and then expressed as an overall percentage response, *i.e.* if a rat withdrew 6 times out of a total 10 Von Frey applications, this was recorded as 60% overall response to that Von Frey filament [13].

2.7.2. Mechanical Hyperalgesia Using Randall-Selitto

Mechanical hyperalgesia was measured using the Randall-Selitto paw pressure test (algometer Ugo Basile, 92,370 Chaville) as described [14]. Briefly, the rat's hind paw was placed into the pressure applicator, and a steadily increasing pressure stimulus (maximum cut-off of 250 g) was applied to the dorsal surface of the paw until withdrawal or vocalization. This was recorded as the nociceptive threshold value. For each animal, two recordings were made for each hind paw, and the data were reported as the mean of both hind paw values [15].

2.8. Western Blotting

2.8.1. Sample Preparation

After treatment, animals ($n = 5$ for each group) were sacrificed by cervical dislocation and decapitated. The dorsal horn of the spinal cord was removed and homogenized in 5 vol. of chilled homogenizing buffer containing 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 1 mM NaVO₄, 0.01 mM PMSF, DTT, and 1% triton X-100 and centrifuged for 10 min at 10,000 rpm. Protein content in supernatant was determined by the Bradford method. Each homogenate was then diluted in homogenization buffer so as to equilibrate the protein content in all the samples.

2.8.2. SDS-PAGE and Chemiluminescence Detection

The SDS-PAGE electrophoresis was carried out under standard denaturing conditions at 15 mA. After electrophoresis, the resolved proteins were transferred (semidry transfer) to blot PVDF membrane (Biorad). The transfer was carried out at 25 V for 2 hr. After transfer, the membrane was put in nonfat protein (5% skimmed milk

in 0.1% TBST) for 2 hr at room temperature. The membrane was incubated with monoclonal antibody for GFAP (1:2500) (Santa Cruz Biotechnology, catalog number sc-6170), CD11b (1:5000) (Santa Cruz Biotechnology, catalog number sc-28664), COX1 (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, catalog number sc-23982) and COX2 (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, catalog number sc-1745) in blocking solution overnight at 4°C. Membrane was subjected to three washings with 0.1% TBST each for 5 min followed by incubation with 1:7000 diluted HRP conjugated goat anti-rat IgG (Santa Cruz Biotechnology, catalog number sc-2032) for 2 hr at room temperature. Chemiluminescence Luminol (Santa Cruz Biotechnology, catalog number sc-2048) was used for the detection of protein bands of interest. Images were scanned with a Densitometer Scanner (GS800, Bio-Rad), and optical density (OD) values were analyzed using Quantity One software (Bio-Rad). To normalize for protein loading, antibodies directed against β -actin were used.

2.9. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR)

Total RNA was extracted from tissue of the dorsal horn of the spinal cord by the TRI reagent (Sigma) according to the manufacturer's instruction. Treated with RNase-free DNase-I (Roche, Indianapolis, IN, USA) and repurified, and then quantified spectrophotometrically. Total RNA (1 μ g) was reverse transcribed (Omniscript RT kit, Qiagen, Valencia, CA, USA) using random hexamers PCR primer. cDNA prepared from mRNA was amplified using the following primer sets:

β -actin forward 5' GCAGGAGTACGATGAGTCCG-3' and reverse 5' ACGCAGCTCAGTAACAGTCC-3'; GFAP forward 5'-AGGGACAATCTCACACAGG-3' and reverse 5'-GACTCAACCTTCTCTCCA-3'; CD11b forward 5'-CTGGGAGATGTGAATGGAG-3' and reverse 5'-ACTGATGCTGGCTACTGATG-3'; COX1 forward 5'-CAGCCCCTCATTACCCATT-3' and reverse 5'-CCTGTTCTACGGAAGGTGGG-3'; COX2 forward 5'-TGAGTACCGCAAACGCTTCT-3' and reverse 5'-TCTAGTCTGGAGTGGGAGGC-3'.

PCR was performed with equal amounts of cDNA in the GeneAmp 7700 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), using SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Reactions (total volume, 25 μ l) were incubated at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Each sample was measured, and data points were examined for integrity by analysis of the amplification plot. The comparative cycle threshold (Ct) method was used for relative quantification of gene expression. The amount of mRNA, normalized to the endogenous control (β -Actin) and relative to a calibrator, is given by $2^{-\Delta\Delta Ct}$, with Ct indicating the cycle number at which the fluorescence signal of the PCR product crosses an arbitrary threshold set within the exponential phase of the PCR, and

$$\Delta\Delta Ct = \left[\left(Ct_{\text{target(unknown sample)}} - Ct_{\text{end.control(unknown sample)}} \right) \right] - \left[\left(Ct_{\text{target(calibrator sample)}} - Ct_{\text{end.control(calibrator sample)}} \right) \right]$$

as previously described [16].

2.10. Statistical Analysis

Data analysis of the results was provided by GraphPad Prism Software (version 5). Numerical results from behavioral tests are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Results were statistically evaluated using Student's *t* test or one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's or Dunnett's post hoc comparisons to compare the results obtained in drug-treated and control groups. Two-way repeated measures ANOVA, followed by Bonferroni's comparison were applied for statistical evaluation of time courses of effects obtained in pharmacological tests. In every case, $p < 0.05$ was considered significant). The log-probit method (Litchfield and Wilcoxon, 1949) was applied to establish median effective doses (ED50) for ECF.

3. Results

3.1. Evaluation of General Toxicity

In order to monitor well-being and determine drug dosing, mice were observed and weighed daily throughout the experiment. All rats survived until the end of study. There were no signs of distress, deterioration of general health, or evidence of severe general toxicity. Repeated treatment to cumulative doses of 100 mg/kg, 150 mg/kg and 200 mg/kg of ECF not caused renal damage or severe body weight loss which would require euthanasia [17].

3.2. Evaluation of Body Weight and Blood Glucose in Rats

It is established that the injection of alloxan monohydrate (ALX) causes hyperglycemia [18]. In this study, we evaluated changes in blood glucose and body weight in rats. The animals of the group (GA) received ALX (150 mg/kg) and those of the control group (Ctrl) saline at 0.9% in a single injection subcutaneously (Table 1). Significant increase in blood glucose level was observed in alloxan-induced diabetic rats compared to healthy non-diabetic animals. $^{**}p < 0.003$. The weight has significantly decreased in alloxan-induced diabetic rats compared to healthy non-diabetic animals. $^*p < 0.01$ (on three days after injection of ALX).

3.3. Development Mechanical Allodynia and Mechanical Hyperalgesia

The injection of alloxan monohydrate (150 mg/kg) in rats induced hyperglycemia after 3 days. Behavioral tests every 3 days in diabetic rats by the Von Frey filament test and the pressure test on the paw were used to determine mechanical allodynia from the 15th day after injection of the chemical, $^{**}p < 0.001$ (Figure 1(a)). The mechanical hyperalgesia was observed from 21st day after the injection of alloxan monohydrate, $^{**}p < 0.004$ (Figure 1(b)). These results demonstrate that diabetes causes the appearance of mechanical allodynia and hyperalgesia.

3.4. Attenuation of Mechanical Allodynia and Mechanical Hyperalgesia by ECF Extracts

To determine whether ECF could reduce the mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia in Alloxan-induced neuropathy, we measured paw withdrawal thresholds by the Von Frey filaments test and the Pressure test in rat after ECF treatment of 5 hours. Our results showed an increase in the sensitivity threshold materialized by weight filaments. Figures 2(a)-(c) show the results of Von Frey filament test respectively for the doses of 100, 150 and 200 mg/kg body weight. Noted a significant difference of 10.4 ± 0.7 g; 12.8 ± 0.8 g; and 14.4 ± 1.1 g, respectively at a dose of 100, 150 and 200 mg/kg compared to the (ND + S) group at 5.2 ± 0.4 g of the dose-dependent manner (the maximum threshold to 2 hours). $^{**}p < 0.003$ for 100 mg/kg body weight; $^{***}p < 0.0001$ for the dose 150 mg/kg body weight and $^{***}p < 0.0001$ for 200 mg/kg for body weight. The pressure paw test for the determination of mechanical hyperalgesia showed a significant increase in the sensitivity threshold materialized by the pressing force of 200.6 ± 18.8 g and 301.6 ± 12.2 g respectively for the dose of 150 and 200 mg/kg

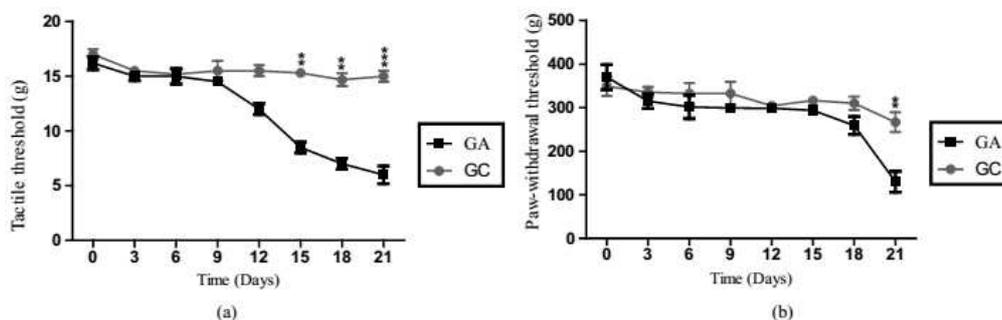


Figure 1. Time evolution of the occurrence of mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia. GC: group of normal rats in 0.9% saline; GA: group of normal rats under alloxan monohydrate at 150 mg/kg. All results are shown with \pm SEM and $p < 0.05$ was considered positive. $^{**}p < 0.001$, $n = 10$ (a) and $^{**}p < 0.004$, $n = 40$ (b).

Table 1. Acute changes in body weight and blood glucose after three days of injection of ALX. Ctrl: control group under 0.9% saline ($n = 10$); GA: group under Alloxan monohydrate (150 mg/kg) ($n = 40$). Significant difference, $^{**}p < 0.003$ for blood glucose and $^*p < 0.01$ for body weight.

Variable group	Blood glucose (mg/dl)	Body weight (g)
Ctrl (N = 10)	93.4 ± 2.73	159.6 ± 11.19
GA (N = 40)	$381.4 \pm 43.8^{**}$	$124.8 \pm 9.56^*$

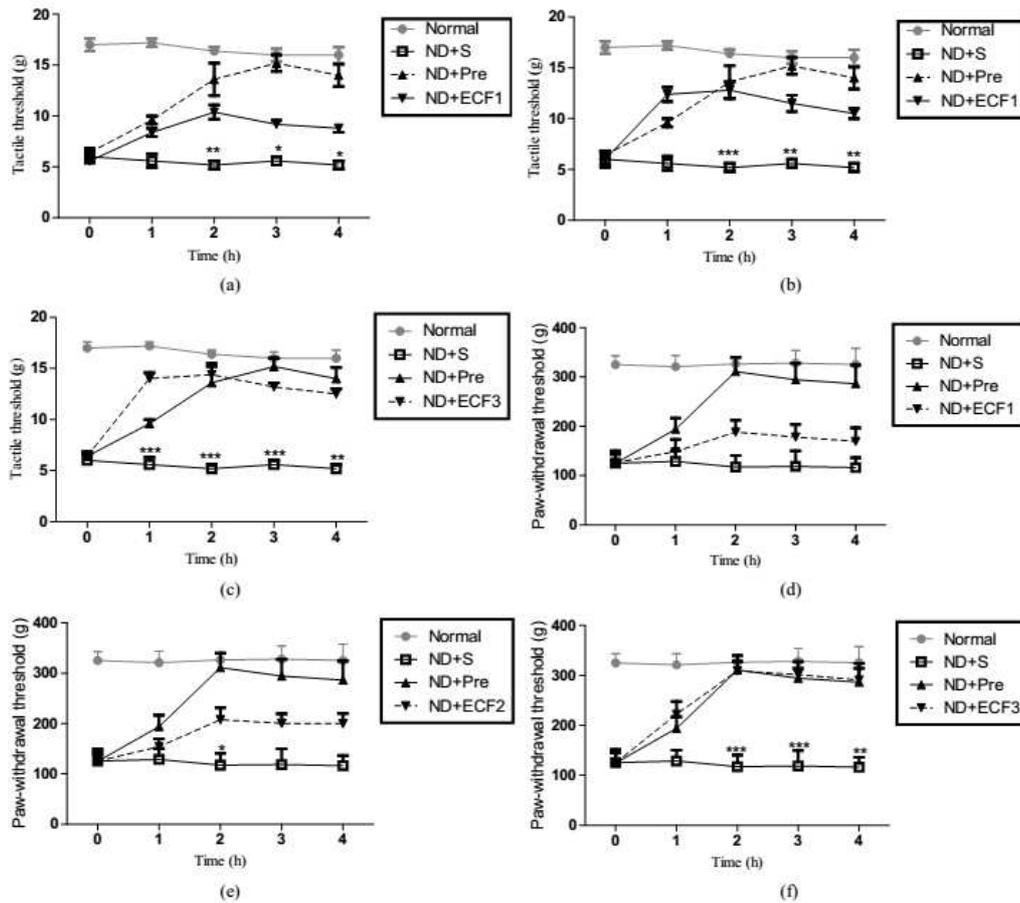


Figure 2. Attenuation of mechanical Allodynia and mechanical hyperalgesia by ECF at 100, 150 and 200 mg/kg body weight. Normal: control group under 0.9% saline; ND + S: Painful diabetic neuropathic rats group under 0.9% saline; ND + Pre: Diabetic neuropathic rats group under pregabalin (10 mg/kg); ND + ECF1: Diabetic neuropathic rats group under *Clerodendrum formicarum* (100 mg/kg body weight); ND + ECF2: Diabetic neuropathic rats group under *Clerodendrum formicarum* (150 mg/kg body weight); ND + ECF3: Diabetic neuropathic rats group under *Clerodendrum formicarum* (200 mg/kg body weight). (a) Effect of ECF (100 mg/kg body weight) on mechanical allodynia, ** $p < 0.003$; (b) Effect of ECF (150 mg/kg body weight) on mechanical allodynia, *** $p < 0.0001$; (c) Effect of ECF (200 mg/kg body weight) on mechanical allodynia, *** $p < 0.0001$; (d) Effect of ECF (100 mg/kg body weight) on mechanical hyperalgesia, $p < 0.07$; (e) Effect of ECF (150 mg/kg body weight) on mechanical hyperalgesia, ** $p < 0.004$; (f) Effect of ECF (100 mg/kg body weight) on mechanical hyperalgesia, *** $p < 0.0001$ (maximum of the sensitivity threshold to 2 hours), $n = 5$.

body weight compared to the (ND + S) group (Figure 2(e) and Figure 2(f)). However, no significant difference was noted with the dose of 100 mg/kg body weight (Figure 2(d)) ($p < 0.07$ for 100 mg/kg body weight; * $p < 0.04$ for 150 mg/kg body weight; *** $p < 0.0001$ for 200 mg/kg body weight). Statistical analysis allowed us to determine the ED₅₀ for mechanical allodynia at 67.5 mg/kg and at 84 mg/kg for mechanical hyperalgesia. These results show that ECF attenuates mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia dose-dependent manner.

3.5. Effect of ECF on GFAP and CD11b in the Painful Neuropathy Diabetic in Rats

One hypothesis put forward to explain the low therapeutic efficacy of drugs used against chronic pain postulated that these drugs have neuronal targets, while the cellular changes associated are not limited only to neurons. In

this context, increasing attention is paid to the role of glial cells, especially astrocytes and microglia [19]. Painful diabetic neuropathy is accompanied by activation of astrocytes and microglial cells characterized by an increase in the mRNA level of expression of CD11b and GFAP [20]. To investigate whether ECF had an inhibitor effect on glial cells, we expressed the markers GFAP and CD11b respectively markers of astrocytes and microglial cells activities among various groups of rats after treatment for 5 days. We expressed by western blotting both proteins materialized by bands of Figure 3(a) and Figure 3(b). For rt-qPCR, we noted a decrease in the mRNA level at 1.5 ± 0.05 ; 1.3 ± 0.1 and 0.8 ± 0.02 , respectively in the group of ECF1 at 100 mg/kg, body weight; 150 mg/kg, body weight and 200 mg/kg body weight, compared to (ND + S) group at 1.9 ± 0.1 ($p < 0.02$ for the

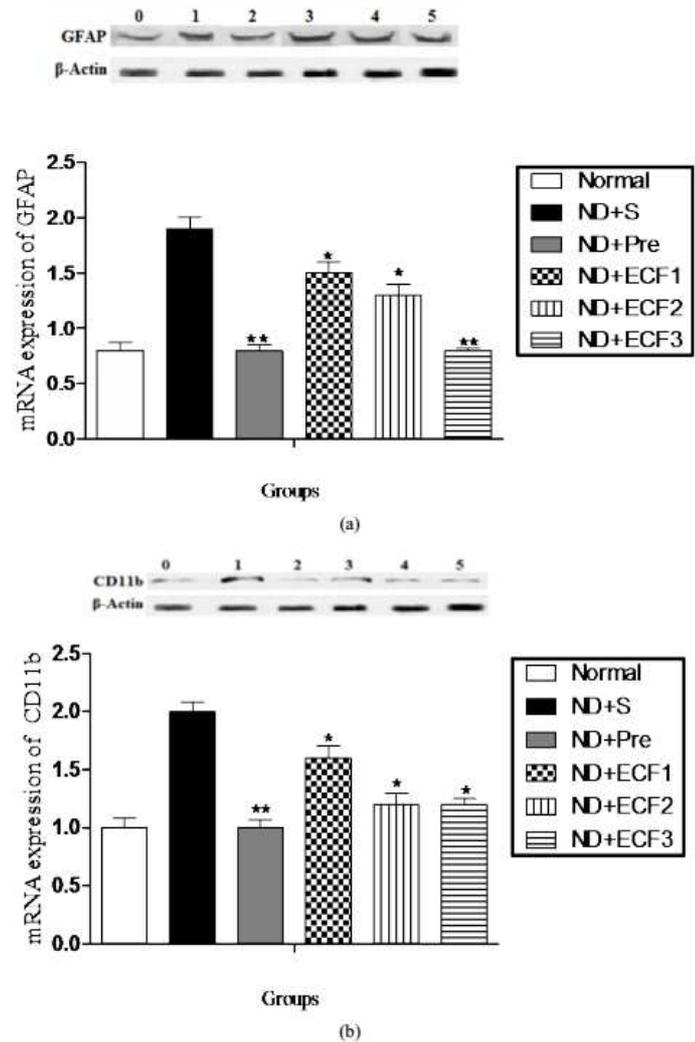


Figure 3. Effects of ECF on GFAP and CD11b after 5 days of the treatment. 0: normal group; 1: Group of painful neuropathic diabetic rats under 0.9%; 2: Group of painful neuropathic diabetic rats under Pre; 3: Group of painful neuropathic diabetic rats under ECF (100 mg/kg); 4: Group of painful neuropathic diabetic rats under ECF (150 mg/kg); 5: Group of painful neuropathic diabetic rats under ECF (200 mg/kg). (a) Effects of ECF on GFAP ($p < 0.02$ for the ECF1 dose; $p < 0.02$ for the ECF2 dose; $**p < 0.001$ for the dose ECF3, $n = 5$) and (b) Effects of ECF on CD11b ($p < 0.01$ for ECF1, $p < 0.01$ for ECF2 and $*p < 0.01$ for ECF3, $n = 5$).

ECF1 dose; * $p < 0.02$ for the ECF2 dose; ** $p < 0.001$ for the dose ECF3, $n = 5$). We also noted, the same observation with microglial cells (* $p < 0.01$ for ECF1, * $p < 0.01$ for ECF2 and * $p < 0.01$ for ECF3, $n = 5$). However, the mRNA level of reduction depends on the dose used. These data suggest generally that ECF inhibits the activity of astrocytes and microglial cells dose-dependent manner.

3.6. Effect of ECF on Cyclooxygenase in the Diabetic Neuropathic Pain

Under normal conditions, glial cells are known for having a number of housekeeping functions in the central nervous system [21]. However, glial cells can contribute to neuropathic pain processing by the activation of intracellular pathways, such as the MAP kinase family and related transcription factors, which leads to an increase in inflammatory mediators [21]. According to these data, we investigated the effect of ECF on COX1 and COX2 involved in neuropathy induced by the ALX. After 5 days of treatment, the analysis of our data between the (ND + ECF2) group under ECF (200 mg/kg) and (ND + S) Group under 0.9% saline showed a significant difference. * $p < 0.01$, $n = 5$ for COX1 (Figure 4(a)) and * $p < 0.03$ for COX2, $n = 5$ (Figure 4(b)). However, there was no

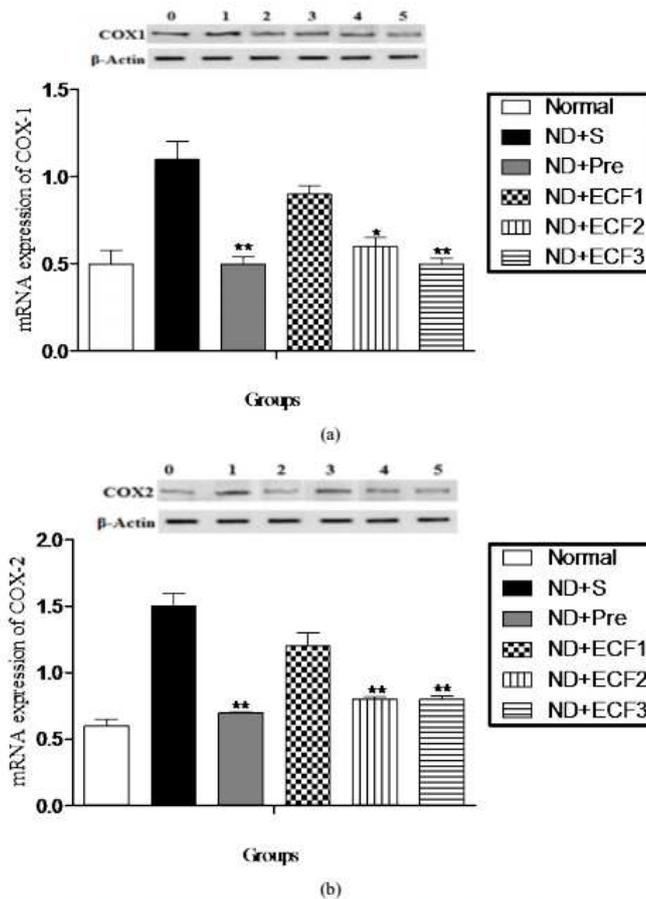


Figure 4. Effects of ECF on COX-1 and COX-2 after 5 days of the treatment. 0: normal group; 1: Group of painful neuropathic diabetic rats under 0.9%; 2: Group of painful neuropathic diabetic rats under Pre; 3: Group of painful neuropathic diabetic rats under ECF (100 mg/kg); 4: Group of painful neuropathic diabetic rats under ECF (150 mg/kg); 5: Group of painful neuropathic diabetic rats under ECF (200 mg/kg). (a) Effects of ECF on COX1 and (b) Effects of ECF on COX2. * $p < 0.01$, $n = 5$ for COX1 (Figure 3(a)) and * $p < 0.03$ for COX2, $n = 5$ for the dose of ECF (200 mg/kg).

difference between the (ND + S) Group and (ND + ECF1) group under ECF (150 mg/kg). These data suggest that the ECF effect on COX is dose-dependent manner.

4. Discussion

Understanding the pain sensitization was mainly focused on the neural mechanisms. However, for over two decades, astrocytes and microglial cells have been recognized as potent modulators of pain and so are new drug targets [21] [22]. In this study, our objective was to evaluate the effect of extracts of *Clerodendrum formicarum* (ECF) on glial cells in the dorsal horn of the spinal cord in the treatment of diabetic neuropathic pain. We described in this study that the injection of alloxan monohydrate (150 mg/kg) subcutaneously in rats created hyperglycemia that was responsible for the development of mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia. In addition, we showed that ECF attenuated mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia in a dose-dependent manner but also inhibit the expression of GFAP and CD11b respectively activation markers of astrocytes and microglial cells after 5 days treatment. Finally, we showed that ECF has an inhibitory effect on mediators of inflammation and pain including cyclooxygenase pathway.

The search for the mechanisms of action of analgesics for the treatment of painful diabetic neuropathy involves developing animal models of pain more suitable [23]. Diabetic neuropathy is a complication of diabetes and it results in diabetic peripheral neuropathy with an increase of sensory loss due to degeneration of nerve fibers [24] [25].

In this study, we developed a diabetic neuropathic pain model using a well-known chemical; it is alloxan monohydrate at a dose of 150 mg/kg as a single injection by the subcutaneous route. It was noted an onset of diabetes on third day after injection of the product. Our data confirm some models where alloxan or streptozotocin is injected by intraperitoneal route [26]-[28]. Although subcutaneously is the least used, however it would be more advantage over the intraperitoneal route to reduce the suffering of the animal.

The appearance of certain characters of neuropathic pain in the 15th day for mechanical allodynia and 21st day for mechanical hyperalgesia in our study correlates with other neuropathic pain models induced by either the intraperitoneal route where genetic models [29] [30]. The problem of pain assessment is thus posed. Indeed it is convenient first-line compared with similar situations in humans. This method could only be truly realistic if the pain was felt in the same way in every individual, man or animal. We know that the neurophysiological mechanisms of transmission of nociceptive stimuli are similar in humans and other mammals. It is also known that the necessary stimuli to trigger these mechanisms are very similar. It is, however, unable to understand the perception of pain in animals: one can determine whether an animal feels a noxious stimulus in the same way and with the same intensity as men. However, we cannot just pass tests based on paw withdrawal to determine the mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia in animals [31].

We have shown that the administration of ECF (100; 150 and 200 mg/kg body weight) for 5 days showed an attenuation of mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia except at a dose of 100 mg/kg where ECF could alleviate mechanical hyperalgesia. These results are consistent with previous studies on the impact of several drugs to lessen the pain [32] [33]. Although the mechanism of action of this medication has never been studied, however, we can hypothesize that a central inhibition which glial cells may be involved.

In agreement with previous studies, we showed that diabetic neuropathic pain is accompanied by an increased level of mRNA expression of GFAP and CD11b [34]-[36]. We noted a decrease in the expression of GFAP and CD11b by ECF. This inhibition correlates with the attenuation of the mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia. We suggest that inhibition of astrocytes and microglial cells is the result of the attenuation of the mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia.

Although neuropathic pain is often resistant to treatments that are effective for inflammatory pain, such as opioids and NSAIDs [37] [38], it is however noted striking of the ECF-based treatment can inhibit diabetic neuropathic pain. ECF inhibits the expression of COX 1 and COX2 in this model of painful diabetic neuropathy. Indeed, the phytochemical composition of the ECF consists partly salicylic derivative, which could justify its action on COX like most non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) [8] [39]. Finally, the pathophysiological mechanism of diabetic neuropathic remains complex and involves several mediators including those of inflammation and pain [40] [41], which could explain the activation of the signaling pathway in this study, which is consistent with the literature. However, we can not specify in this study whether inhibition of COX by ECF is direct or indirect [42] [43].

Finally, the application of traditional medicine ECF is done by applying the subcutaneous route powder (scarification) to treat headache, chronic pain and rheumatism. However, administration of ECF is also by other routes including oral or topical application of the tab depending on the disease [44]. Thus, we support the subcutaneous application of ECF in diabetic neuropathies. The administration doses would be 10 times less than the dose applied in the rat.

5. Conclusion

Definitely, our data showed that an alternative is possible to treat many diseases including diabetic neuropathic pain. Clinical evaluation is necessary to improve and make the treatment of ECF visible.

Acknowledgements

We thank Mrs. Judith Banzouzi Loumikou who administratively and hardly worked for the realization of this project. We also have to say thanks to Professor Mbayang Ndiaye Niang for the supervision of this project.

Conflicts of Interest

There was no conflict of interest in this work.

References

- [1] Barrett, A.M., Lucero, M.A., Le, T., Robinson, R.L., Dworkin, R.H. and Chappell, A.S. (2007) Epidemiology, Public Health Burden, and Treatment of Diabetic Peripheral Neuropathic Pain: A Review. *Pain Medicine*, **8**, S50-S62. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1526-4637.2006.00179.x>
- [2] Miranda-Massari, J.R., Gonzalez, M.J., Jimenez, F.J., Allende-Vigo, M.Z. and Duconge, J. (2011) Metabolic Correction in the Management of Diabetic Peripheral Neuropathy: Improving Clinical Results beyond Symptom Control. *Current Clinical Pharmacology*, **6**, 260-273. <http://dx.doi.org/10.2174/157488411798375967>
- [3] Patel, N., Mishra, V., Patel, P. and Dikshit, R.K. (2014) A Study of the Use of Carbamazepine, Pregabalin and Alpha Lipoic Acid in Patients of Diabetic Neuropathy. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, **13**, 62. <http://dx.doi.org/10.1186/2251-6581-13-62>
- [4] Dodda, D. and Ciddi, V. (2014) Plants Used in the Management of Diabetic Complications. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **76**, 97-106.
- [5] Raafat, K. and Samy, W. (2014) Amelioration of Diabetes and Painful Diabetic Neuropathy by *Punicagranatum* L. Extract and Its Spray Dried Biopolymeric Dispersions. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2014**, 180495. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/180495>
- [6] Shaikh, A.S. and Somani, R.S. (2010) Animal Models and Biomarkers of Neuropathy in Diabetic Rodents. *Indian Journal of Pharmacology*, **42**, 129-134. <http://dx.doi.org/10.4103/0253-7613.66833>
- [7] Ziegler, D., Sohr, C.G. and Nourooz-Zadeh, J. (2004) Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Relation to the Severity of Diabetic Polyneuropathy and Cardiovascular Autonomic Neuropathy. *Diabetes Care*, **27**, 2178-2183. <http://dx.doi.org/10.2337/diacare.27.9.2178>
- [8] Ali, M.S., Ahmed, Z., Ali, M.I. and Ngoupayo, J. (2010) Formadienoate A and B: Two New Long Chained Feruloyl Esters from *Clerodendrum formicarum* Gürke (Lamiaceae) of Cameroon. *Natural Product Communications*, **5**, 919-922.
- [9] Tauseef, S., Ali, M.S., Ahmed, A., Ali, M.I., Ahmed, Z., Sherwani, S.K., Ahmed, G., Onocha, A.O., Ngoupayo, J., Kamdem Waffo, A.F. and Tauseef, F. (2013) *In Vitro* Antioxidant Activity Analysis of Five Medicinally Important Plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, **2**, 183-188.
- [10] Zimmermann, M. (1983) Ethical Guidelines for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals. *Pain*, **16**, 109-110. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959\(83\)90201-4](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959(83)90201-4)
- [11] Orman, M.A., Berthiaume, F., Androulakis, L.P. and Ierapetritou, M.G. (2011) Advanced Stoichiometric Analysis of Metabolic Networks of Mammalian Systems. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, **39**, 511-534. <http://dx.doi.org/10.1615/CritRevBiomedEng.v39.i6.30>
- [12] Sun, W., Miao, B., Wang, X.-C., Duan, J.-H., Ye, X., Han, W.-J., Wang, W.-T., Luo, C. and Hu, S.-J. (2012) Gastrodin Inhibits Allodynia and Hyperalgesia in Painful Diabetic Neuropathy Rats by Decreasing Excitability of Nociceptive Primary Sensory Neurons. *PLoS ONE*, **7**, e39647. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0039647>
- [13] Flatters, S.J. and Bennett, G.J. (2004) Ethosuximide Reverses Paclitaxel- and Vincristine-Induced Painful Peripheral

- Neuropathy. *Pain*, **109**, 150-161. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2004.01.029>
- [14] Stöhr, T., Krause, E. and Selve, N. (2006) Lacosamide Displays Potent Antinociceptive Effects in Animal Models for Inflammatory Pain. *European Journal of Pain*, **10**, 241-249. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpain.2005.04.002>
- [15] Bang, S., Yoo, S., Yang, T.J., Cho, H., Kim, Y.G. and Hwang, S.W. (2010) Resolvin D1 Attenuates Activation of Sensory Transient Receptor Potential Channels Leading to Multiple Anti-Nociception. *British Journal of Pharmacology*, **161**, 707-720. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00909.x>
- [16] Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, **25**, 402-408. <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- [17] Tä, L.E., Bieber, A.J., Carlton, S.M., Loprinzi, C.L., Low, P.A., *et al.* (2010) Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Is Essential for Cisplatin-Induced Heat Hyperalgesia in Mice. *Molecular Pain*, **6**, 15. <http://dx.doi.org/10.1186/1744-8069-6-15>
- [18] Sebai, H., Selmi, S., Rtibi, K., Souli, A., Gharbi, N. and Sakly, M. (2013) Lavender (*Lavandula stoechas* L.) Essential Oils Attenuate Hyperglycemia and Protect against Oxidative Stress in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Lipids in Health and Disease*, **12**, 189. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-111X-12-189>
- [19] Clarke, C.B., Suter, M.R. and Gosselin, R.-D. (2013) Cellules gliales et douleur chronique: Du laboratoire à l'espoir clinique. *Revue Médicale Suisse*, **392**, 1342-1345.
- [20] Homs, J., Pagès, G., Ariza, L., Casas, C., Chillón, M., Navarro, X. and Bosch, A. (2014) Intrathecal Administration of IGF-1 by AAVrh10 Improves Sensory and Motor Deficits in a Mouse Model of Diabetic Neuropathy. *Molecular Therapy—Methods & Clinical Development*, **1**, Article No. 7. <http://dx.doi.org/10.1038/mtm.2013.7>
- [21] Milligan, E.D. and Watkins, L.R. (2009) Pathological and Protective Roles of Glia in Chronic Pain. *Nature Reviews Neuroscience*, **10**, 23-36. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2533>
- [22] Tesfaye, S., Boulton, A.J.M., Dyck, P.J., Freeman, R., Horowitz, M., Kempler, P., Lauria, G., Malik, R.A., Spallone, V., Vinik, A., Bernardi, L. and Valensi, P. (2010) Diabetic Neuropathies: Update on Definitions, Diagnostic Criteria, Estimation of Severity, and Treatments. On behalf of the Toronto Diabetic Neuropathy Expert Group. *Diabetes Care*, **33**, 2285-2293.
- [23] Islam, M.S. (2013) Animal Models of Diabetic Neuropathy: Progress since 1960s. *Journal of Diabetes Research*, **2013**, Article ID: 149452.
- [24] Tracy, J.A. and Dyck, P.J.B. (2008) The Spectrum of Diabetic Neuropathies. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, **19**, 1-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmr.2007.10.010>
- [25] Callaghan, B.C., Cheng, H., Stables, C.L., Smith, A.L. and Feldman, E.L. (2012) Diabetic Neuropathy: Clinical Manifestations and Current Treatments. *The Lancet Neurology*, **11**, 521-534. [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70065-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70065-0)
- [26] Höke, A. (2012) Animal Models of Peripheral Neuropathies. *Neurotherapeutics*, **9**, 262-269. <http://dx.doi.org/10.1007/s13311-012-0116-y>
- [27] O'Brien, P.D., Sakowski, S.A.I., Eva, L. and Feldman, E.L. (2014) Mouse Models of Diabetic Neuropathy. *ILAR Journal*, **54**, 259-272. <http://dx.doi.org/10.1093/ilar/ilt052>
- [28] Nadig, P.D., Revankar, R.R., Dethe, S.M., Narayanswamy, S.B. and Aliyar, M.A. (2012) Effect of *Tinospora cordifolia* on Experimental Diabetic Neuropathy. *Indian Journal of Pharmacology*, **44**, 580-583. <http://dx.doi.org/10.4103/0253-7613.100380>
- [29] Davidson, E., Coppey, L., Lu, B., Arballo, V., Calcutt, N.A., Gerard, C. and Yorek, M. (2010) The Roles of Streptozotocin Neurotoxicity and Neutral Endopeptidase in Murine Experimental Diabetic Neuropathy. *Experimental Diabetes Research*, **2009**, Article ID: 431980.
- [30] Shakher, J. and Stevens, M.J. (2011) Update on the Management of Diabetic Polyneuropathies. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, **4**, 289-305.
- [31] Zychowska, M., Rojewska, E., Pilat, D. and Mika, J. (2015) The Role of Some Chemokines from the CXC Subfamily in a Mouse Model of Diabetic Neuropathy. *Journal of Diabetes Research*, **2015**, Article ID: 750182. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/750182>
- [32] Rocha-González, E.I., Ramírez-Aguilar, M., Granados-Soto, V., Reyes-García, J.G., Torres-López, J.E., Huerta-Cruz, J.C. and Navarrete, A. (2014) Antineuropathic Effect of 7-Hydroxy-3,4-Dihydrocadalin in Streptozotocin-Induced Diabetic Rodents. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **14**, 129. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-14-129>
- [33] Chen, S.-R., Samoriski, G. and Pan, H.-L. (2009) Antinociceptive Effects of Chronic Administration of Uncompetitive NMDA Receptor Antagonists in a Rat Model of Diabetic Neuropathic Pain. *Neuropharmacology*, **57**, 121-126. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.04.010>

- [34] Wattanathorn, J., Thirapattthanavong, P., Muchimapura, S., Thukhammee, W., Lertra, K. and Suriharn, B. (2015) The Combined Extract of *Zingiber officinale* and *Zea Mays* (Purple Color) Improves Neuropathy, Oxidative Stress, and Axon Density in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2015**, Article ID: 301029. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/301029>
- [35] Rondón, L.J., Privat, A.M., Daulhac, L., Davin, N., Mazur, A., Fialip, J., Eschalié, A. and Courteix, C. (2010) Magnesium Attenuates Chronic Hypersensitivity and Spinal Cord NMDA Receptor Phosphorylation in a Rat Model of Diabetic Neuropathic Pain. *The Journal of Physiology*, **588**, 4205-4215. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2010.197004>
- [36] Schreiber, A.K., Nones, C.F.M., Reis, R.C., Chichorro, J.G. and Cunha, J.M. (2015) Diabetic Neuropathic Pain: Physiopathology and Treatment. *World Journal of Diabetes*, **6**, 432-444. <http://dx.doi.org/10.4239/wjd.v6.i3.432>
- [37] Kohno, T., Ji, R.R., Ito, N., Allchorne, A.J., Befort, K., Karchewski, L.A. and Woolf, C.J. (2005) Peripheral Axonal Injury Results in Reduced Mu Opioid Receptor Pre- and Post-Synaptic Action in the Spinal Cord. *Pain*, **117**, 77-87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2005.05.035>
- [38] Kehlet, H., Jensen, T.S. and Woolf, C.J. (2006) Persistent Postsurgical Pain: Risk Factors and Prevention. *The Lancet*, **367**, 1618-1625. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68700-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68700-X)
- [39] Kellogg, A.P., Cheng, H.T. and Pop-Busui, R. (2008) Cyclooxygenase-2 Pathway as a Potential Therapeutic Target in Diabetic Peripheral Neuropathy. *Current Drug Targets*, **9**, 68-76. <http://dx.doi.org/10.2174/138945008783431691>
- [40] Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G. and Julius, D. (2009) Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*, **139**, 267-284. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>
- [41] Ackermann, P.W. and Hart, D.A. (2013) Influence of Comorbidities: Neuropathy, Vasculopathy, and Diabetes on Healing Response Quality. *Advances in Wound Care*, **2**, 410-421. <http://dx.doi.org/10.1089/wound.2012.0437>
- [42] Yagihashi, S., Mizukami, H. and Sugimoto, K. (2010) Mechanism of Diabetic Neuropathy: Where Are We Now and Where to Go? *Journal of Diabetes Investigation*, **2**, 18-32. <http://dx.doi.org/10.1111/j.2040-1124.2010.00070.x>
- [43] Farmer, K.L., Li, C. and Dobrowsky, R.T. (2012) Diabetic Peripheral Neuropathy: Should a Chaperone Accompany Our Therapeutic Approach? *Pharmacological Reviews*, **64**, 880-900. <http://dx.doi.org/10.1124/pr.111.005314>
- [44] Bouquet, A. (1969) Féticheurs et médecine traditionnelles du Congo (Brazzaville). Mémoires O.R.S.T.O.M., No. 36, 282 p.

Abbreviations

CD11b: Cluster of Differentiation 11b.

COX: Cyclooxygenase.

ECF: Leaves Extracts of *Clerodendrum formicarum*.

ED50: Effective Dose 50.

GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein.

IRD: Institut de Recherche pour le Développement.

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis.

III. DISCUSSION GENERALE.

III.1. Discussion méthodologique.

Nous discutons dans cette partie, quelques points concernant les principales techniques utilisées dans cette thèse.

III.1.1. Modèle animal de la douleur neuropathique diabétique.

Les modèles précliniques de la douleur neuropathique qui reflètent plus fidèlement l'état physiopathologique chez l'homme posent un problème éthique depuis plus de deux décennies. Une multitude de modèles de douleur neuropathique a été développée au cours des dernières années dont les modèles de lésions des nerfs périphériques induite par un anti-cancer, la thérapie antirétrovirale ou une substance pancréas-toxique pour des modèles diabétiques [Cata et al. 2008]. Dans nos travaux, le modèle du rat rendu diabétique par l'Alloxane monohydrate reproduit un mécanisme lésionnel métabolique (diabète de type 1) et les symptômes habituels de douleur notamment l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie mécanique. On peut globalement reprocher à ce modèle que la chronicité induite est toute relative, puisque les animaux ont été étudiés que pendant 4 semaines. De même, les déficits (hypoesthésie) sont inexplorables comme dans la plus part des études de douleur neuropathique [Coronado et al. 211].

Les lésions induites souvent dans ce modèle sont définitives. Nous avons utilisée dans notre étude, l'alloxane monohydrate en une dose unique contrairement à ce qui se fait dans certaines études où la substance chimiotoxique est injectée pendant plusieurs jours. En effet, ce modèle serait moins traumatisant et moins stressant pour l'animal du fait d'une seule injection. Enfin, dans ce modèle nous avons injecté l'alloxane par voie sous-cutanée contrairement aux études antérieures qui ont utilisées la voie intra-péritonéale. Cette substance serait moins toxique par la voie sous-cutanée par rapport à la voie intra-péritonéale. Cependant, nous pouvons admettre un parallélisme sur les résultats entre nos données à celles de la littérature [Cortright et al. 2008]. L'altération de l'état général des animaux matérialisée par une chute pondérale est constatée quelque soit la substance chimiotoxique utilisée ou la voie d'induction du diabète.

Bien que la pertinence clinique du modèle soit remise en cause en raison de l'altération de l'état général des animaux et de l'absence de modifications morphologiques des nerfs périphériques, des nombreux travaux ont contribué à une meilleure connaissance physiopathologique et pharmacologique de la neuropathie diabétique douloureuse, à l'amélioration des modalités thérapeutiques [Dina et al. 2008].

III.1.2. Les tests comportementaux.

Dans le cadre des études sur la douleur en expérimentation animale, les tests comportementaux sont largement utilisés. Cependant, ces tests connaissent des nombreuses limites et sont de plus en plus critiqués.

Déterminer lesquelles constituent les indicateurs les plus importants ou les plus significatifs quant à l'état de l'animal, ou ce qui est plus important pour le scientifique, quels sont les indicateurs les plus importants d'une détérioration irréversible de l'état de l'animal, n'est pas une tâche facile. Dans cette étude, nous avons utilisé deux manipulateurs pour exécuter les tâches et interpréter les résultats. Les études qui se penchent sur le modèle de l'arthrite induit par adjuvant chez le rat, donnent un aperçu des difficultés rencontrées pour trouver/choisir les bonnes observations [Baron, 2000]. Bien que des changements furent notés dans la fréquence de l'occurrence de plusieurs types de comportements (les rats se cabraient, couraient, mangeaient, buvaient et grimpaient moins mais se reposaient, s'immobilisaient et se grattaient plus), la conclusion fut que l'augmentation du grattage fut le changement comportemental le plus significatif lié au développement de l'arthrite, indiquant une douleur chronique. De telles évaluations comportementales [Gregory et al. 2013] peuvent être de projet de recherche, nécessitant de nombreuses heures de travail technique ainsi que de l'équipement coûteux de surveillance et d'analyse. Il peut sembler peu réaliste d'exiger un niveau semblable d'évaluation préliminaire dans la recherche.

Les modèles animaux de la nociception ont deux composantes importantes: l'allodynie et l'hyperalgésie. Les modèles les plus appropriés, lésionnels ou chimiotoxique ou d'autres manipulations, devraient produire la nociception en récapitulant les mécanismes de conditions cliniques spécifiques. De même, les mesures de comportement nociceptif doivent non seulement détecter les réponses à la douleur,

mais devraient la faire d'une manière compatible avec l'expérience clinique de la douleur. Dans nos travaux, nous avons utilisé les mesures de comportements réflexifs tels que le retrait des seuils à des stimuli nocifs. Ces mesures ont été utilisées pendant des décennies pour examiner les mécanismes de la douleur et ont fait progresser notre compréhension des bases physiologiques de la nociception, l'identification des neurotransmetteurs, les récepteurs, les messagers intracellulaires, et des gènes impliqués dans les comportements de la douleur; et une meilleure compréhension des traitements pharmacologiques et non pharmacologiques de la douleur existante vont être mieux appréhender [Basbaum et al. 2009; Woolf ,2011]. En outre, au cours des dernières décennies, l'action pharmacologique (par exemple, efficacité, puissance, durée d'action) d'un large spectre d'analgésiques pour réduire les réponses sensorielles réflexives dans des modèles de rongeurs de la nociception aiguë et de la douleur chronique ont démontré la ressemblance conforme à l'analgésie humaine [Yaksh, 2002]. Il est clair que d'autres tests comportementaux peuvent également produire des renseignements précieux qui ne peuvent être acquise uniquement à partir des tests réflexifs. Le débat qui concerne les tests comportementaux se concentre sur l'échec de la traduction des données scientifiques de base dans les analgésiques efficaces et a conduit à un réexamen de l'utilité des modèles animaux de la douleur et des mesures comportementales pour le criblage de nouveaux analgésiques potentiels. Un échec bien connu est celui des antagonistes des récepteurs de la neurokinine 1 (substance P) [Hill, 2000]. Plusieurs raisons ont été avancées pour ces échecs [Mogil, 2009]. Une préoccupation est la dépendance des études sur les mesures réflexives, et il a été suggéré que des mesures supplémentaires d'intégration supraspinal qui utilisent des comportements de douleur non-réflexifs doivent être inclus, comme des mesures opérant d'apprentissage, des comportements nociceptifs spontanées, et la qualité de vie ou de la mesure de l'activité physique [Bausman et al. 2009]. Une autre préoccupation est l'utilisation de modèles animaux de la maladie qui ne reflètent pas l'état clinique que l'expérimentateur cherche à modéliser.

Les Tests réflexifs de la douleur évaluent les réponses comportementales évoquées après l'application de la chaleur, du froid, d'une pression mécanique, et des stimuli électriques. Plusieurs de ces réactions peuvent se produire en l'absence d'activation supraspinale. Ces réactions nécessitent un système moteur intact [Höke, 2012]. Les tests comportementaux réflexifs imitent plus étroitement les études humaines de réponse améliorée aux stimuli nocifs (hyperalgésie), qui est distincte de la douleur en réponse à des stimuli anodins (allodynie) et de la douleur au repos (douleur spontanée). L'Hyperalgésie chez les personnes atteintes de la fibromyalgie (les seuils de pression de la douleur) est significativement corrélée avec la douleur du mouvement évoqué. En définitif, ces tests réflexifs peuvent donner un aperçu de réponses à la douleur évoqués chez des animaux. Il est donc essentiel de comprendre le test pour l'interprétation des données et la comparaison entre la littérature publiée.

Les mesures comportementales de sensibilité mécanique sont couramment utilisées pour mesurer l'allodynie (une réponse douloureuse à un stimulus non douloureux) et l'hyperalgésie. C'est ce qui nous a amené à utiliser les mesures comportementales dans cette étude. Initialement utilisé pour tester la sensibilité mécanique chez l'homme [Von Frey, 1896], les seuils de retrait mécanique de la patte en utilisant des filaments de Von Frey sont couramment utilisés chez les rongeurs [Dixon, 1980]. Une approche alternative à des seuils de mesure est d'examiner la fréquence de la réponse à l'application répétée d'un seul filament de Von Frey [Sluka, 1997; Sluka et al. 2003]. Les filaments de Von Frey mesure l'hyperalgésie cutanée ou d'allodynie et est donc plus utile pour mimer les conditions cliniques et améliorer la sensibilité cutanée tels que la douleur neuropathique, la douleur postopératoire, l'inflammation, ou même l'arthrose [Farrel et al 2000].

Le test de pression pour mesurer les réponses de la douleur par l'utilisation d'une pression sur une patte se fait avec un analgisiomètre comme le Randall-Selitto analgesiometer [Barron et al. 2007]. Dans tous ces essais, le temps de latence de retrait ou de vocalisation est utilisé comme point final, et l'animal doit être retenu.

Ces test produisent des résultats similaires à ceux observés communément dans des conditions de douleur clinique comme la fibromyalgie, la douleur myofasciale ou l'arthrose [Arendt-Nielsen et al. 2010].

En général, la mesure du comportement de la douleur réflexive est utile pour étudier les mécanismes sous-jacents associés à l'allodynie et l'hyperalgésie. La capacité d'appliquer les intensités spécifiées thermiques, mécaniques, les forces et les concentrations des stimuli chimiques permet la génération de fonctions de stimulus / réponse précis. En outre, la possibilité de quantifier la nature de la réponse évoquée a été utile pour la corrélation de signaux électrophysiologiques et biochimiques de comportements de douleur mesurée. Il a été reconnu, toutefois, que les mesures de la douleur à partir des réponses réflexives pourraient ne pas saisir pleinement l'expérience de la douleur [Bennett, 2007].

III.1.3. Méthodes de Biologie moléculaire.

Les techniques de Biologie moléculaire occupent un intérêt croissant en neurosciences depuis une décennie [Schneider et al. 2013]. Ses atouts sont en effet nombreux. Elles permettent le décodage de l'information portée par un gène donnée. La transcription différentielle des gènes dans une cellule (spatio-temporelle) permet de déterminer sa fonction et ses propriétés [Sullivan et al. 2007 ; Van Belle et al. 2009]. Plusieurs techniques de Biologie moléculaire sont utilisées en neurosciences afin d'exprimer soit une protéine ou un gène. Nous citons par exemple la real time polymerase chain (rt-PCR) ou la PCR à temps réel qui est couramment utilisée pour exprimer les gènes (ARN ou l'ADN), la technique de Western blot et d'immunohistochimie ou l'immunofluorescence pour exprimer les protéines.

Dans cette étude, nous avons utilisé principalement deux techniques : la rt-PCR pour exprimer les ARNm et le Western blot pour exprimer les protéines des molécules suivantes GFAP, CD11b, Cox1 et Cox2. L'utilisation de ses deux techniques est justifiée par la sensibilité de la rt-PCR et de la spécificité de la technique de Western Blot.

Les résultats obtenus par ces techniques ont contribué à identifier certaines cibles de *Clerodendrum formicarum* et à vérifier l'implication des cellules gliales et de la voie de signalisation de la cyclooxygénase.

III.1.4. Choix d'utilisation des extraits de feuilles de *Clerodendrum*

***formicarum*.**

La valorisation des plantes médicinales est une priorité que plusieurs états en développement sont entrain d'inscrire dans leur programme de développement. En Afrique tropicale en générale et dans la sous-région Afrique centrale, *Clerodendrum formicarum* est utilisée par des tradi-thérapeutes pour traiter plusieurs pathologies dont les douleurs chroniques [Ali et al. 2010b]. Dans cet optique, nous avons mené cette étude afin d'évaluer les effets de cette plante dans la douleur neuropathique. Une étude comportementale nous a permis de montrer que cette plante avait un effet positif sur la douleur.

III.2. Discussion des résultats.

Au cours de cette dernière décennie, des progrès considérables ont été accomplis dans la compréhension des mécanismes biochimiques sous-tendant la douleur neuropathie et par conséquent, de nouvelles modalités de traitement sont à l'étude [Boulton et al. 2005]. Dans cette présente étude, nous avons noté une hyperglycémie à 3 jours après l'injection de l'alloxane monohydrate (150 mg/kg). Ensuite, il y a eu l'apparition de l'allodynie mécanique à partir du 14^e jour et de l'hyperalgésie mécanique à partir du 21^e jour. Nous avons aussi déterminé une atténuation de l'allodynie mécanique et de l'hyperalgésie mécanique par les extraits de feuilles de *Clerodendrum formicarum* de manière dépendante de la dose. Ensuite, nous avons montré une inhibition centrale nociceptive par les ECF matérialisée par la diminution de l'expression des marqueurs GFAP et CD11b respectivement marqueurs d'activation des astrocytes et des cellules microgliales. Enfin, nous avons montré que *Clerodendrum formicarum* inhibe l'expression des deux isoformes de la voie de signalisation de la Cyclooxygénase.

III.2.1. Rôle de l'hyperglycémie dans la pathogenèse de la douleur neuropathique diabétique.

Dans cette étude, nous avons vérifié si l'hyperglycémie est impliquée dans la pathogenèse de la douleur neuropathique diabétique. En effet, il est connu que l'hyperglycémie a un rôle dans l'histoire naturelle de la neuropathie diabétique révélé

par les études épidémiologiques et confirmé par une étude expérimentale récente [Homs et al. 2011]. L'étude épidémiologique révèle dans la cohorte de prévention primaire concernant des sujets indemnes de neuropathie lors de leur inclusion, que l'insulinothérapie intensive pendant 5 ans, réduit de 69 % l'apparition de la neuropathie par comparaison au traitement comportant 1 ou 2 injections d'insuline/jour [Chaplan et al. 1994].

Dans notre étude, nous avons noté une évolution croissante de l'hyperglycémie qui est responsable de l'apparition de l'allodynie mécanique et de l'hyperalgésie mécanique chez 86,6% des rats diabétiques. Ces résultats confirment le rôle de l'hyperglycémie comme un facteur important de la lésion nerveuse responsable de la douleur neuropathique [Chaplan et al. 1994].

A côté de ces données bien établies, il apparaît qu'en contrepartie 50 % des patients, quel que soit leur type de diabète, quel que soit le niveau de leur équilibre glycémique ne développe pas de neuropathie clinique, même après 20 ans d'évolution [Courteix et al. 1993]. A l'opposé, certains patients peuvent présenter une neuropathie invalidante peu de temps après le diagnostic de diabète [Schneider et al. 2013]. Ces constatations suggèrent l'existence de facteurs indépendants de l'état de l'hyperglycémie chronique dans la physiopathologie de la neuropathie. Ces facteurs pourraient être génétiques et/ou liés à l'environnement notamment nutritionnel.

III.2.2. L'Allodynie et l'hyperalgésie dans la douleur neuropathique diabétique.

L'allodynie et l'hyperalgésie neuropathique s'accompagnent de modifications corticales très incomplètement reproduites par les modèles expérimentaux. L'allodynie expérimentale et l'allodynie neuropathique partagent l'activation de la « matrice douleur » corticale, ainsi que la bilatéralisation des activités insulaires [Islam, 2013]. Néanmoins, l'allodynie expérimentale tend à accroître l'activité des réseaux limbiques et affectifs du cortex périgénuat et orbitofrontal, ce sont les procédures d'analgésie qui conduisent à l'hyperactivité de ces mêmes structures en situation d'allodynie neuropathique. Cela laisse supposer que leur rôle dans l'allodynie expérimentale serait

réactif et protecteur, et que l'incapacité à générer leur activation pourrait contribuer à l'expression clinique de la douleur neuropathique [Chaplan et al. 1994].

Cependant, dans de nombreuses études animales, ces deux paramètres ont contribué à la détermination et au suivi de la douleur chronique chez l'animal. Dans notre étude, nous avons déterminé l'allodynie mécanique et de l'hyperalgésie mécanique bien que l'interprétation des tests de comportements à la sensibilité fait l'objet de plusieurs études et critiques [Barton et al. 2007 ; Bhangoo et al. 2009 ; O'Brien et al. 2014]. Enfin, nous avons montré que les ECF atténuent l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie mécanique de manière dépendante de la dose. Les ECF pourraient être considérés comme une alternative anti-nociceptive dans la neuropathie diabétique douloureuse comme biens d'autres plantes naturelles étudiées [Jack et Wright, 2012 ; Dodda et Ciddi, 2014].

III.2.3. Rôle des cellules gliales dans la douleur neuropathique diabétique.

La compréhension de la sensibilisation à la douleur et de l'hyperalgésie soit essentiellement centrée sur les mécanismes neuronaux ; les astrocytes et la microglie a été reconnus comme de puissants modulateurs de la douleur et sont donc de nouvelles cibles pour développer des médicaments antidouleur [Milligan and Watkins 2009]. En condition normale, les cellules de la glie fonctionnent comme des macrophages du système nerveux central (SNC) et comme des sentinelles des blessures et infections [Milligan and Watkins 2009]. Les cellules gliales activées présentent sur le plan moléculaire une surexpression des marqueurs spécifiques notamment les GFAP et les CD11b respectivement comme marqueur des astrocytes et des cellules microgliales [Watkins et al. 2007]. Les cellules gliales libèrent également une panoplie de molécules signal comme les cytokines et les chimiokines [Milligan and Watkins 2009] qui augmentent la sensibilisation neuronale centrale et la douleur persistante induite par une atteinte des nerfs [Watkins et al. 2007].

Les astrocytes n'expriment pas les GFAP, cependant ils sont considérés comme marqueur astroglieuse. Il en est de même pour les CD11b qui sont exprimés par la quasi-totalité des cellules micro-gliales.

Dans ce travail, nous avons exprimés les GFAP et les CD11b par rt-PCR et par Western Blot. Nos résultats ont montré une surexpression de ces marqueurs chez les rats neuropathiques douloureux. Ces données confirment que les astrocytes et les cellules microgliales sont impliqués dans la genèse et la physiopathologie de la douleur neuropathique [Takatsuru et al. 2007].

III.2.4. Effet des ECF sur les cellules gliales dans la douleur neuropathique diabétique.

Nous avons montré dans cette étude que l'activation des astrocytes et des cellules microgliales est constatée pendant la douleur neuropathique diabétique. Cette activation des cellules gliales est matérialisée par la surexpression de GFAP et de CD11b. De nombreux médicaments ont été développées depuis une dizaine d'année ciblant les cellules gliales et certaines substances chimiques libérées par les cellules gliales [Rondón et al. 2010]. En accord avec les études antérieures, nous avons montré que la douleur neuropathique diabétique est accompagnée par une augmentation du niveau d'expression d'ARNm de GFAP et de CD11b [Chen et al. 2009 ; Rondón et al. 2010 ; Schreiber et al. 2015]. Cependant le traitement des ECF à des doses différentes induisent une inhibition de l'expression de GFAP et de CD11b. Cette inhibition est en corrélation avec l'atténuation de l'allodynie mécanique et de l'hyperalgésie mécanique. Nous pouvons suggérer que l'inhibition des astrocytes et des cellules microgliales est la conséquence de l'atténuation de l'allodynie mécanique et de l'hyperalgésie, et par conséquent une inhibition de la sensibilité centrale notamment au niveau spinal.

III.2.5. Rôle de la voie de signalisation de la cyclooxygenase dans la douleur neuropathique diabétique.

Un point important de nos travaux est l'implication de la voie de la cyclooxygenase dans la physiopathologie de la douleur neuropathique diabétique. Dans ces travaux, nous avons exprimés les isoformes 1 et 2 de la voie de la cyclooxygenase après la détermination de la douleur neuropathique diabétique. Bien que plusieurs études aient évoquées une absence des lésions sur les nerfs périphériques, cependant

l'hyperglycémie constatée entraîne une lésion au niveau central. Cette lésion centrale serait responsable de l'activation de la voie de la cyclooxygénase. Nos données montrent pour la première fois à notre connaissance une activation de la voie de signalisation de la cyclooxygénase matérialisée par la surexpression des deux isoformes 1 et 2 dans la douleur neuropathique diabétique.

III.2.6. Effets des ECF sur la voie de signalisation de la cyclooxygénase.

Le mécanisme principal de plusieurs antalgiques est l'inhibition de la synthèse de prostaglandines (PG). Ils agissent en inhibant l'activité de la cyclo-oxygénase (Cox)[Pop-Bosui et al. 2002]. Le but reste la diminution de PGG₂, le mécanisme de l'inhibition, développée par les antalgiques périphériques, diffère selon les produits : il s'agit soit d'une inhibition compétitive, soit d'une acétylation irréversible d'un radical au niveau du site actif de l'enzyme [Eisenach et al. 2010].

Ainsi, les ECF qui contiennent dans sa composition des dérivées des acides salicyliques, pourraient agir comme tous les salicylés en abaissant la concentration locale de PGG₂ par inhibition de sa synthèse en déprimant l'activité des cyclo-oxygénases d'origine périphérique et centrale [Arumugan et al. 2009 ; Neumann et Birbaumer, 2003].

Nous avons noté une inhibition de l'expression de Cox1 et de Cox2 de façon significative après 5 jours de traitement aux ECF à des doses différentes.

Ainsi, nous pouvons nous accorder de l'effet antalgique des ECF. Dans cette étude, nous ne sommes pas intéressés à étudier les effets secondaires liés à ce traitement, bien que l'inhibition de Cox1 est accompagnée par des nombreux effets secondaires [Eisenach, 2010].

CONCLUSION GENERALE

I. CONCLUSION.

Le traitement de la douleur présente des enjeux économiques, sociologiques et médicaux très importants. En dépit d'avancées majeures au cours des 20 dernières années, les douleurs neuropathiques s'avèrent résistantes aux différents antalgiques utilisés en clinique. Les nouvelles approches dans la thérapie de la douleur neuropathiques exigent une bonne compréhension physiopathologique de la maladie et des mécanismes d'action sous-jacents les traitements. D'où l'intérêt de cette étude qui a consisté à analyser les mécanismes d'action d'un traitement alternatif issu de la pharmacopée traditionnelle africaine à base de *Clerodendrum formicarum*.

A propos de son effet sur l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie mécanique, cette étude a permis de suggérer que les ECF a une activité antalgique qui agirait par un mécanisme d'inhibition de la sensibilité centrale. A cet effet, les cellules gliales notamment les astrocytes et les cellules microgliales sont des cibles cellulaires dans le traitement de la douleur neuropathique diabétique. Leur action serait médié par les molécules d'activation et de signalisation comme celle de la voie de cyclooxygénase que nous avons étudié dans cette étude.

Concernant le mécanisme d'activation par l'hyperglycémie et l'inhibition de la voie de cyclooxygénase par les ECF, cette étude a révélé une possible inflammation à bas bruit dans la douleur neuropathique diabétique qui pourrait être prévenue par les ECF.

Les ECF pourraient donc offrir un choix alternatif pour traiter la neuropathie diabétique par le contrôle de symptômes de la douleur et son action inhibitrice sur les molécules du système nerveux. En définitif, cette étude a montré des effets bénéfiques de *Clerodendrum formicarum* dans la douleur neuropathique diabétique.

II. PERSPECTIVES.

L'ensemble de ces résultats met en évidence la multiplicité des cibles pharmacologiques potentielles dans ce traitement de la douleur neuropathique diabétique par *Clérodendrum formicarum*. En effet, cette étude nous a montré que les ECF inhibent l'activation des cellules astrocytes, des cellules microgliales et de la voie de signalisation de la cyclooxygenase. Il est intéressant de :

- Identifier les récepteurs spécifiques de chaque composante.
- Etudier la possible inflammation à bas bruit.
- Etudier les effets des ECF sur les marqueurs inflammatoires
- Mener des études toxicologiques et biochimiques afin d'écarter les éventuels effets indésirables.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Ali MS, Ahmed Z, Ali MI, Ngoupayo J. Two new aromatic acids from *Clerodendrum formicarum* Gurke (Lamiaceae) of Cameroon. *J Asian Nat Prod Res.* 2010 t;12(10):894-8. doi: 10.1080/10286020.2010.509718.

Ali MS, Ahmed Z, Ali MI, Ngoupayo J. Formadienoate-A and B: two new long chained feruloyl esters from *Clerodendrum formicarum* (Lamiaceae) of Cameroon. *Nat Prod Commun.* 2010 Jun;5(6):919-22.

Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 1999; 22: 208–215.

Arendt-Nielsen L, Nie H, Laursen MB, Laursen BS, Madeleine P, Simonsen OH, Graven-Nielsen T. Sensitization in patients with painful knee osteoarthritis. *Pain.* 2010;149:573–581.

Arnold T, Betsholtz C., The importance of microglia in the development of the vasculature in the central nervous system. *Vasc Cell* 2013 ; 5 : 4.

Arumugam TV, Woodruff TM, Lathia JD, Selvaraj PK, Mattson MP, Taylor SM. Neuroprotection in Stroke by Complement Inhibition and Immunoglobulin Therapy. *Neuroscience.* 2009 ; 158(3): 1074–1089

Audinat E, Arnoux I. La microglie : des cellules immunitaires qui sculptent et contrôlent les synapses neuronales. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 153–159.

Bang S, Yoo S, Yang TJ, Cho H, Kim YG, Hwang SW. Resolvin D1 attenuates activation of sensory transient receptor potential channels leading to multiple anti-nociception. *Br J Pharmacol.* 2010; 161(3): 707–720. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00909.x

Barkho BZ, Song H, Aimone JB, Smrt RD, Kuwabara T, Nakashima K, Gage FH, Zhao X. Identification of astrocyte-expressed factors that modulate neural stem/progenitor cell differentiation. *Stem Cells Dev.* 2006; 15(3): 407–421. doi: 10.1089/scd.2006.15.407

Baron R. Peripheral neuropathic pain: from mechanisms to symptoms. *Clin J Pain*. 2000 Jun; 16(2 Suppl):S12-20.

Barton ME, Eberle EL, Shannon HE. The antihyperalgesic effects of the T-type calcium channel blockers ethosuximide, trimethadione, and mibefradil. *Eur J Pharmacol*. 2005 Oct 3; 521(1-3):79-85.

Barton NJ, Strickland IT, Bond SM, Brash HM, Bate ST, Wilson AW, Chessell IP, Reeve AJ, McQueen DS. Pressure application measurement (PAM): a novel behavioural technique for measuring hypersensitivity in a rat model of joint pain. *J Neurosci Methods*. 2007;163:67–75.

Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*. 2009 ; 139(2): 267–284. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.028.

Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009;139:267–284

Bennett GJ, Xie Y-K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1988;33(1):87–107.

Berta T, Liu T, Liu Y-C, Xu Z-Z, Ji R-R. Acute morphine activates satellite glial cells and up-regulates IL-1 β in dorsal root ganglia in mice via matrix metalloprotease-9. *Mol Pain*. 2012; 8: 18. doi: 10.1186/1744-8069-8-18

Besson JM, Chaouch A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol Rev*. 1987 Jan;67(1):67-186.

Besson JM; Chaouch A; Chitour D. Structures impliquées dans les processus nociceptifs. In : la douleur et son traitement. Paris, Arnette, 1988, p. 7-36.

Biel M, Wahl-Schott C, Michalakis S, Zong X. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev.* 2009 Jul; 89(3):847-85.

Bhadada SK, Sahay RK, Jyotsna VP. et al. Diabetic Neuropathy: Current Concepts. *Journal of Indian Academy of Clinical Medicine.* 2001;2:304–318.

Bhangoo SK, Ripsch MS, Buchanan DJ, Miller RJ, White FA. Increased chemokine signaling in a model of HIV1-associated peripheral neuropathy. *Mol Pain.* 2009;5:48.

Boger A, Bhadra N, Gustafson KJ (2013). Different Clinical Electrodes Achieve Similar Electrical Nerve Conduction Block. *J Neural Eng.* 2013 ; (5): 056016.doi: 10.1088/1741-2560/10/5/056016

Borsook. Neurological diseases and pain. *Brain.* 2012 ; 135(2): 320–344.doi: 10.1093/brain/awr271.

Bouhassira D, Attal N. Douleurs neuropathiques. *Douleur et Analgésie.* 2012.(2) : 140-167.

Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, Malik RA, Maser RE, Sosenko JM, Ziegler D. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care.* 2005;28:956–962.

Buchheit T, de Ven TV, Shaw A .Epigenetics and the Transition from Acute to Chronic Pain. *Pain Med.* 2012 ;13(11): 1474–1490. doi: 10.1111/j.1526-4637.2012.01488.x

Bussmann RW. The Globalization of Traditional Medicine in Northern Peru: From Shamanism to Molecules. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 2013: 291903. Published online 2013 Dec 28. doi: 10.1155/2013/291903

Calo' G, Guerrini R, Rizzi A, Salvadori S, Regoli D. Pharmacology of nociceptin and its receptor: a novel therapeutic target. *Br J Pharmacol.* 2000 April; 129(7): 1261–1283. doi: 10.1038/sj.bjp.0703219.

Cameron NE, Cotter MA. Dissociation between biochemical and functional effects of the aldose reductase inhibitor, ponalrestat, on peripheral nerve in diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 1992 December; 107(4): 939–944.

Campbell JN, Meyer RA. Mechanisms of Neuropathic Pain. *Neuron.* 2006 ; 52(1): 77–92. doi: 10.1016/j.neuron.2006.09.021

Cata JP, Weng HR, Dougherty PM. Behavioral and electrophysiological studies in rats with cisplatin-induced chemoneuropathy. *Brain Res.* 2008;1230:91–98.

Cetas JS, Saedi T, Burchiel KJ. Destructive procedures for the treatment of no malignant pain: a structured literature review. *J Neurosurg.* 2008;109:389–404.

Chauhan A, Mehla R, Vijayakumar TS, Handy I. Endocytosis-Mediated HIV-1 Entry and Its Significance in the Elusive Behavior of the Virus in Astrocytes. *Virology.* 2014; 0: 1–19. doi: 10.1016/j.virol.2014.03.002.

Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods.* 1994;53:55–63.

Chatterjee D, Biswas K, Nag S, Ramachandra SG, Das Sarma J. Microglia Play a Major Role in Direct Viral-Induced Demyelination. *Clin Dev Immunol.* 2013; 2013: 510396. doi: 10.1155/2013/510396.

Chen S-R, Samoriski G, Pan H-L. Antinociceptive Effects of Chronic Administration of Uncompetitive NMDA Receptor Antagonists in a Rat Model of Diabetic Neuropathic Pain. *Neuropharmacology.* 2009;57(2): 121–126. doi: 10.1016/j.neuropharm.2009.04.010.

Chen FL, Dong YL, Zhang ZJ, Cao DL, Xu J, Hui J, Zhu L, Gao YJ. Activation of astrocytes in the anterior cingulate cortex contributes to the affective component of pain in an inflammatory pain model. *Brain Res Bull.* 2012 Jan 4; 87(1):60-6.

Chen J, Lariviere WR. The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: A double-edged sword. *Prog Neurobiol.* 2010 ; 92(2): 151–183.doi: 10.1016/j.pneurobio.2010.06.006.

Chomsung RD, Wei H, Day-Brown JD, Petry HM, Martha E. Bickford. Synaptic Organization of Connections between the Temporal Cortex and Pulvinar Nucleus of the Tree Shrew. *Cereb Cortex.* 2010; 20(4): 997–1011.doi: 10.1093/cercor/bhp162.

Coronado RA, Kindler LL, Valencia C, George SZ. Thermal and pressure pain sensitivity in patients with unilateral shoulder pain: comparison of involved and uninvolved sides. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2011;41:165–173.

Cortright DN, Matson DJ, Broom DC. New Frontiers in assessing pain and analgesia in laboratory rodents. *Expert Opinion on Drug Discovery.* 2008;3:1099–1108

Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage. *Annu Rev Neurosci.* 2009; 32: 1–32. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135531.

Courteix C, Eschalier A, Lavarenne J (1993) Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. *Pain* 53:81-88.

Cunningham CL, Martinez-Cerdeno V, Noctor SC. Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 2013 ; 33 : 4216–4233.

Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain.* 2000;87:149–158.doi: 10.1016/S0304-3959(00)00276-1.

Dina OA, Green PG, Levine JD. Role of interleukin-6 in chronic muscle hyperalgesic priming. *N S*. 2008;152:521–525.

Dixon WJ. Efficient analysis of experimental observations. *Annual Review of Pharmacological Toxicology*. 1980;20:441–462.

Domercq M, Vázquez-Villoldo N, Matute C. Neurotransmitter signaling in the pathophysiology of microglia. *Front Cell Neurosci*. 2013; 7: 49. doi: 10.3389/fncel.2013.00049.

Dodda D, Ciddi V. Plants Used in the Management of Diabetic Complications. *Indian J Pharm Sci*. 2014; 76(2): 97–106.

Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest*. 2010 ; 120(11): 3760–3772. doi: 10.1172/JCI42843.

Edwards JL, Vincent A, Cheng T, Feldman EL. Diabetic Neuropathy: Mechanisms to Management. *Pharmacol Ther*. 2008 ; 120(1): 1–34. doi: 10.1016/j.pharmthera.2008.05.005.

Edwards JL, Vincent A, Cheng T, Feldman EL. Diabetic Neuropathy: Mechanisms to Management. *Pharmacol Ther*. 2008 ; 120(1): 1–34

Eisenach JC, Curry R, Rauck R, Pan P, Yaksh TL. Role of spinal cyclooxygenase in human postoperative and chronic pain. *Anesthesiology*. 2010 ; 112(5): 1225–1233. doi: 10.1097/ALN.0b013e3181d94dc0.

Farrell M, Gibson S, McMeeken J, Helme R. Pain and hyperalgesia in osteoarthritis of the hands. *J Rheumatol*. 2000;27:441–447.

Field MJ, Cox PJ, Stott E, Melrose H, Offord J, Su T-Z, Bramwell S, Corradini L, England S, Winks J, Kinloch RA, Hendrich J, Dolphin AC, Webb T, Williams D.

Identification of the $\alpha_2\text{-}\delta\text{-1}$ subunit of voltage-dependent calcium channels as a molecular target for pain mediating the analgesic actions of pregabalin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 November 14; 103(46): 17537–17542.

Flatters SJ, Bennett GJ. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain*. 2004; 109(1-2):150-61.

Forman LJ, Estilow S, Lewis M, Vasilenko P (1986) Streptozocin diabetes alters immunoreactive beta-endorphin levels and pain perception after 8 wk in female rats. *Diabetes* 35:1309-1313

Gao YJ, Ji RR. Targeting astrocyte signaling for chronic pain. *Neurotherapeutics*. 2010 Oct; 7(4):482-93.

Gao YJ, Xu ZZ, Liu YC, Wen YR, Decosterd I, Ji RR. The c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in spinal astrocytes is required for the maintenance of bilateral mechanical allodynia under a persistent inflammatory pain condition. *Pain*. 2010 Feb; 148(2):309-19.

Greenspan JD, Craft RM, LeResche L, Arendt-Nielsen L, Berkley KJ, Fillingim RB, Gold MS, Holdcroft A, Lautenbacher S, Mayer EA, Mogil JS, Murphy AZ, Traub RJ. Studying sex and gender differences in pain and analgesia: A consensus report. *Pain*. 2007 ; 132 (Suppl 1): S26–S45. doi: 10.1016/j.pain.2007.10.014.

Gregory N, Harris AL, Robinson CR, Dougherty PM, Fuchs PN, and Sluka KA. An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. *J Pain*. 2013 Nov; 14(11): 10.1016/j.jpain.2013.06.008.

Guo W, Wang H, Watanabe M, Shimizu K, Zou S, LaGraize SC, Wei F, Dubner R, Ren K. Glial-cytokine-neuronal interactions underlying the mechanisms of persistent pain. *J Neurosci*. 2007 May 30; 27(22):6006-18.

Halassa MM, Haydon PG. Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu Rev Physiol* 2010 ; 72 : 335–355.

Han SY, Jin HC, Yang WD, Lee JH, Cho SH, Chae WS, Lee JS, Kim YI. The Effect of Low-dose Ketamine on Post-caesarean Delivery Analgesia after Spinal Anesthesia. *Korean J Pain*. 2013 ; 26(3): 270–276. doi: 10.3344/kjp.2013.26.3.270

Harden RN, Bruehl S, Perez RSGM, Birklein F, Marinus J, Maihofner C, Lubenow T, Buvanendran A, Mackey S, Graciosa J, Mogilevski M, Ramsden C, Chont M, Vatine J-J. Validation of proposed diagnostic criteria (the “Budapest Criteria”) for Complex Regional Pain Syndrome. *Pain*. 2010,150(2):268-274. doi: 10.1016/j.pain.2010.04.030.

Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*. 1988;32:77–88. doi: 10.1016/0304-3959(88)90026-7.

Harry GJ. Microglia During Development and Aging. *Pharmacol Ther*. 2013 ;139(3): 313–326. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.04.013.

Haslam C, Nurmikko T. Pharmacological treatment of neuropathic pain in older persons. *Clin Interv Aging*. 2008 March; 3(1): 111–120.

He XH, Zang Y, Chen X, Pang RP, Xu JT, Zhou X, Wei XH, Li YY, Xin WJ, Qin ZH, Liu XG. TNF- α contributes to up-regulation of Nav1.3 and Nav1.8 in DRG neurons following motor fiber injury. *Pain*. 2010 ; 151(2):266-79.

Higgins A, Yuan S, Wang Y, Burrell BD. Differential modulation of nociceptive versus non-nociceptive synapses by endocannabinoids. *Mol Pain*. 2013; 9: 26.doi: 10.1186/1744-8069-9-26.

Hill R. NK1 (substance P) receptor antagonists--why are they not analgesic in humans? *Trends Pharmacol Sci*. 2000;21:244–246.

Höke A. Animal Models of Peripheral Neuropathies. *Neurotherapeutics*. 2012 April; 9(2): 262–269. doi: 10.1007/s13311-012-0116-y.

Homs J, Ariza L, Pages G, Verdu E, Casals L, Udina E, Chillon M, Bosch A, Navarro X. Comparative study of peripheral neuropathy and nerve regeneration in NOD and ICR diabetic mice. *J Peripher Nerv Syst*. 2011;16:213–227.

Honore P, Rogers SD, Schwei MJ, Salak-Johnson JL, Luger NM, Sabino MC, Clohisy DR, Mantyh PW. Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons. *Neuroscience*. 2000; 98(3):585-98.

Islam MS. Animal Models of Diabetic Neuropathy: Progress Since 1960s. *J Diabetes Res*. 2013; 2013: 149452. doi: 10.1155/2013/149452

Jack MM, Wright DE .The Role of Advanced Glycation Endproducts and Glyoxalase I in Diabetic Peripheral Sensory Neuropathy. *Transl Res*. 2012 ; 159(5): 355–365.

Janig W, Baron R. Complex regional pain syndrome is a disease of the central nervous system. *Clin Auton Res*. 2002;12:150–64.

Javed S, Petropoulos IN, Alam U, Malik RA .Treatment of painful diabetic neuropathy. *Ther Adv Chronic Dis*. 2015 January; 6(1): 15–28. doi: 10.1177/2040622314552071.

Jha MK, Jeon S, Suk K. Glia as a Link between Neuroinflammation and Neuropathic Pain. *Immune Netw.* 2012 ; 12(2): 41–47. doi: 10.4110/in.2012.12.2.41

Ji RR, Gereau RW, Malcangio M, Strichartz GR. MAP kinase and pain. *Brain Res Rev.* 2009;60:135–48.

Ji K, Akgul G, Wollmuth LP, Tsirka SE .Microglia Actively Regulate the Number of Functional Synapses. *PLoSOne.* 2013; 8(2): 56293. doi: 10.1371/journal.pone.0056293

Ji R-R, Berta T, Nedergaard M. Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy?. *Pain.* 2013 ; 154(01): S10–S28. doi: 10.1016/j.pain.2013.06.022

Justins DM. Management strategies for chronic pain. *Ann Rheum Dis.* 1996 ; 55(9): 588–596.
Kaur S, Pandhi P, and Dutta P. Painful diabetic neuropathy: an update. *Ann Neurosci.* 2011 ; 18(4): 168–175. doi:10.5214/ans.0972-7531.1118409.

Kennedy DA , Lupattelli A , Koren G, Nordeng H. Herbal medicine use in pregnancy: results of a multinational study. *BMC Complement Altern Med.* 2013; 13: 355. doi: 10.1186/1472-6882-13-355

Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Phys Rev* 2011 ; 91 : 461–553.

Kibungu kembelo. Quelques Plantes Médicinales du Bas-Congo et leurs usages. http://www.nzenzeflowerspauwels.be/Plantes_medicinales_Kibungu.pdf (1984). (8 JUIN 2015).

Kilgore KL, Bhadra N (2014). Reversible Nerve Conduction Block Using Kilohertz Frequency Alternating Current. *Neuromodulation.* 2014 ; (3): 242–255. doi: 10.1111/ner.12100.

Kim W, Kim SK, Min B-II. Mechanisms of Electroacupuncture-Induced Analgesia on Neuropathic Pain in Animal Model. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 2013: 436913. doi: 10.1155/2013/436913.

Kim J, Loggia ML, Edwards R, Wasan AD, Gollub RL, Napadow V. Sustained deep-tissue pain alters functional brain connectivity. *Pain.* 2013; 154(8): 1343–1351. doi: 10.1016/j.pain.2013.04.016.

Kohno T, Moore KA, Baba H, Woolf CJ. Peripheral nerve injury alters excitatory synaptic transmission in lamina II of the rat dorsal horn. *J Physiol.* 2003;548:131–138. doi: 10.1113/jphysiol.2002.036186.

Kyranou M, Puntillo K. The transition from acute to chronic pain: might intensive care unit patients be at risk?. *Ann Intensive Care.* 2012; 2: 36. doi: 10.1186/2110-5820-2-36

LaMotte RH, Lundberg LE, Torebjörk HE. Pain, hyperalgesia and activity in nociceptive C units in humans after intradermal injection of capsaicin. *J Physiol.* 1992 March; 448: 749–764.

Latremoliere A, Woolf CJ. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *J Pain.* 2009 September; 10(9): 895–926. doi: 10.1016/j.jpain.2009.06.012.

Laurent B ; Ollagnon-Roman E. Douleurs par désafférentation. In : Bureau F. (eds), pratique du traitement de la douleur. Paris , 1984, 2, (suppl), 656.

Legendre P, Le Corrionc H. Cellules microgliales et développement du système nerveux central chez l'embryon. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 147–152.

Liu H, Roppolo JR, de Groat WC, Tai C (2009). The Role of Slow Potassium Current in Nerve Conduction Block Induced by High-Frequency Biphasic Electrical Current. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2009 ; 56(1): 137. doi: 10.1109/TBME.2008.2006013.

Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*.25:402–8.

McGreevy K, Bottros MM, Raja SN.Preventing Chronic Pain following Acute Pain: Risk Factors, Preventive Strategies, and their Efficacy.*Eur J Pain Suppl*. 2011 ; 5(2): 365–372. doi: 10.1016/j.eujps.2011.08.013

Medhurst SJ, Walker K, Bowes M, Kidd BL, Glatt M, Muller M, Hattenberger M, Vaxelaire J, O'Reilly T, Wotherspoon G, Winter J, Green J, Urban L (2002) A rat model of bone cancer pain. *Pain* 96:129-140.

Melissa A. Farmer, Marwan N. Baliki, A. Vania Apkarian. A Dynamic Network Perspective ofChronic Pain.*Neurosci Lett*. 2012 ;520(2): 197–203. doi: 10.1016/j.neulet.2012.05.001.

Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. *Sci* 1965;150: 971–9

Melzack R, Wall PD. Acupuncture and transcutaneous electrical nerve stimulation.*Postgrad Med J*. 1984 ; 60(710): 893–896.

Mogil JS. Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci*.2009;10:283–294.

Moulin DE, Boulanger A , Clark AJ , Clarke H, Dao T, Finley GA, Furlan A, Gilron I, Gordon A, Morley-Forster PK, Sessle BJ, Squire P, Stinson J, Taenzer P, Velly A, Ware MA, Weinberg EL, Williamson OD. Pharmacological management of chronic neuropathic pain: Revised consensus statement from the Canadian Pain Society. *Pain Res Manag*. 2014 ,19(6): 328–335.

Nagy J. Alcohol Related Changes in Regulation of NMDA Receptor Functions. *Curr Neuropharmacol*. 2008 March; 6(1): 39–54. doi: 10.2174/157015908783769662.

Nathan PW, Rudge P. Testing the gate-control theory of pain in man. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1974 ; 37(12): 1366–1372..

Neugebauer V, Galhardo V, Maione S, Mackey SC. Forebrain Pain Mechanisms. *Brain Res Rev*. 2009 ; 60(1): 226–242. doi: 10.1016/j.brainresrev.2008.12.014.

Neumann N , Birbaumer N . Predictors of successful self control during brain-computer communication. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003 ; 74(8): 1117–1121. doi: 10.1136/jnnp.74.8.1117

Niu J, Ding L, Li JJ, Kim H, Liu J, Li H, Moberly A, Badea TC, Duncan ID, Son Y-J, Scherer SS, Luo W. Modality-Based Organization of Ascending Somatosensory Axons in the Direct Dorsal Column Pathway. *J Neurosci*. 2013; 33(45): 17691–17709. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3429-13.2013.

Obata K, Noguchi K. MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. *Life Sci*. 2004 Apr 9; 74(21):2643-53.

Obata K, Katsura H, Mizushima T, Sakurai J, Kobayashi K, Yamanaka H, Dai Y, Fukuoka T, Noguchi K. Roles of extracellular signal-regulated protein kinases 5 in spinal microglia and primary sensory neurons for neuropathic pain. *J Neurochem*. 2007 Sep; 102(5):1569-84.

O'Brien PD, Sakowski SAI, Eva L. Feldman EL. Mouse Models of Diabetic Neuropathy. *ILAR J*. 2014 ;54(3): 259–272. doi: 10.1093/ilar/ilt052.

Ochoa J. Pain in local nerve lesions. In : *Culp* , 1982, p. 568-587.

Orman MA, Berthiaume F, Androulakis LP, Ierapetritou MG. Advanced Stoichiometric Analysis of Metabolic Networks of Mammalian Systems. *Crit Rev Biomed Eng*. 2011; 39(6): 511–534.

Ren W, Neugebauer V. Pain-related increase of excitatory transmission and decrease of inhibitory transmission in the central nucleus of the amygdala are mediated by mGluR1. *Mol Pain*. 2010;6:93. doi: 10.1186/1744-8069-6-93

Ringkamp M, Schepers RJ, Shimada SG, Johanek LM, Hartke TV, J. Borzan J, Shim B, LaMotte RH, Meyer RA. A role for nociceptive, myelinated nerve fibers in itch sensation. *J Neurosci*. 2011 October 19; 31(42): 14841–14849. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3005-11.2011.

Rondón LJ, Privat AM, Daulhac L, Davin N, Mazur A, Fialip J, Eschalié A, Courteix C. Magnesium attenuates chronic hypersensitivity and spinal cord NMDA receptor phosphorylation in a rat model of diabetic neuropathic pain. *J Physiol*. 2010 ; 588(Pt 21): 4205–4215. doi: 10.1113/jphysiol.2010.197004.

Roumier A, Pascual O, Bechade C, et al. Prenatal activation of microglia induces delayed impairment of glutamatergic synaptic function. *PLoS One* 2008 ; 3 : e2595.

Ruscheweyh R, Wilder-Smith O, Drdla R, Liu X-G, Sandkühler J. Long-term potentiation in spinal nociceptive pathways as a novel target for pain therapy. *Mol Pain*. 2011; 7: 20. doi: 10.1186/1744-8069-7-20.

Scadding JW. Development of ongoing activity, mechanosensitivity, and adrenaline sensitivity in severed peripheral nerve axons. *Exp Neurol*. 1981 Aug; 73(2):345-64.

Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, et al. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 2012 ; 74 : 691–705.

Schneider A, Chatterjee S, Bousiges O, Selvi BR, Swaminathan A, Cassel R, Blanc F, Kundu TK, Boutillier A-L. Acetyltransferases (HATs) as Targets for Neurological Therapeutics. *Neurotherapeutics*. 2013 October; 10(4): 568–588. doi: 10.1007/s13311-013-0204-7

Schreiber AK, Nones CFM, Reis RC, Chichorro JG, Cunha JM. Diabetic neuropathic pain: Physiopathology and treatment. *World J Diabetes*. 2015 ;6(3): 432–444.doi: 10.4239/wjd.v6.i3.432.

Schwei MJ, Honore P, Rogers SD, Salak-Johnson JL, Finke MP, Ramnaraine ML, Clohisey DR, Mantyh PW (1999) Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. *J Neurosci* 19:10886-10897.

Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*. 1990;43:205–218.

Shibata K, Sugawara T, Fujishita K, Shinozaki Y, Matsukawa T, Suzuki T, Koizumi S. The Astrocyte-Targeted Therapy by Bushi for the Neuropathic Pain in Mice. *PLoS One*. 2011; 6(8): e23510. doi: 10.1371/journal.pone.0023510.

Sluka KA. The role of the cyclic AMP transduction cascade in mechanical allodynia and hyperalgesia induced by intradermal injection of capsaicin in rats. *Br J Pharmacol*.1997;122:1165–1173.

Sluka KA. Stimulation of deep somatic tissue with capsaicin produces long-lasting mechanical allodynia and heat hypoalgesia that depends on early activation of the cAMP pathway. *J Neurosci*. 2002;22:5687–5693.

Smith BH, Torrance N, Ferguson JA, Bennett MI, Serpell MG, Dunn KM. Towards a definition of refractory neuropathic pain for epidemiological research. An international Delphi survey of experts. *BMC Neurol*. 2012; 12: 29. doi: 10.1186/1471-2377-12-29

Song P, Zhao ZQ. The involvement of glial cells in the development of morphine tolerance. *Neurosci Res*. 2001 ; 39(3):281-6.

Spruce MC, Potter J, Coppini DV. The pathogenesis and management of painful diabetic neuropathy: a review. *Diabet Med.* 2003 ; 20(2):88-98.

Sullivan KA, Hayes JM, Wiggin TD, Backus C, Su Oh S, Lentz SI, Brosius F, 3rd, Feldman EL. Mouse models of diabetic neuropathy. *Neurobiol Dis.* 2007;28:276–285.

Sullivan KA, Lentz SI, Roberts JL, Jr, Feldman EL. Criteria for creating and assessing mouse models of diabetic neuropathy. *Curr Drug Targets.* 2008;9:3–13.

Takatsuru Y, Iino M, Tanaka K, Ozawa S. Contribution of glutamate transporter GLT-1 to removal of synaptically released glutamate at climbing fiber-Purkinje cell synapses. *Neurosci Lett.* 2007;420:85–89.

Tasker JG, Oliet SH, Bains JS, et al. Glial regulation of neuronal function: from synapse to systems physiology. *J Neuroendocrinol* 2012 ; 24 : 566–576.

Tauseef S, Ali MS, Ahmed A, Ali MI, Ahmed Z, Sherwani SK, Ahmed G, Onocha AO, Ngoupayo J, KamdemWaffo AF, Tauseef F. In vitro Antioxidant activity analysis of five medicinally important plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2013; (4): 183-188.

Trafton JA, Basbaum AI. The contribution of spinal cord neurokinin-1 receptor signaling to pain. *J Pain.* 2000 Sep;1(3 Suppl):57-65.

Treede RD, Meyer RA, Raja SN, Campbell JN. Evidence for two different heat transduction mechanisms in nociceptive primary afferents innervating monkey skin. *J Physiol.* 1995 ; 483(Pt 3): 747–758.

Tsacopoulos M, Evêquoz-Mercier E, Perrottet P, Buchner E. Honeybee retinal glial cells transform glucose and supply the neurons with metabolic substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 November; 85(22): 8727–8731.

Tsigos C, Reed P, Weinkove C, White A, Young RJ. Plasma norepinephrine in sensory diabetic polyneuropathy. *Diabetes Care*. 1993 May; 16(5):722-7.

Panatier A, Vallée J, Haber M, et al. Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell* 2011 ; 146 : 785–798.

Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 2011 ; 333 : 1456–1458.

Parpura V, Heneka MT, Montana V, et al. Glial cells in (patho)physiology. *J Neurochem* 2012 ; 121 : 4–27.

Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 2009 ; 32 : 421–431.

Perkins M, Dray A. Novel pharmacological strategies for analgesia. *Ann Rheum Dis*. 1996 October; 55(10): 715–722.

Perge JA, Niven JE, Mugnaini E, Balasubramanian V, Sterling P. Why do axons differ in caliber?. *J Neurosci*. 2012 ; 32(2): 626–638. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4254-11.2012.

Perry VH, O'Connor V. The role of microglia in synaptic stripping and synaptic degeneration: a revised perspective. *ASN Neuro*. 2010; 2(5): e00047. .doi: 10.1042/AN20100024

Pfrieger F. Roles of glial cells in synapse development. *Cell Mol Life Sci*. 2009 ; 66(13): 2037–2047. doi: 10.1007/s00018-009-0005-7.

Phillips TJC, Cherry CL, Cox S, Marshall SJ, Rice ASC. Pharmacological Treatment of Painful HIV-Associated Sensory Neuropathy: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials. *PLoS One*. 2010; 5(12): e14433. doi: 10.1371/journal.pone.0014433.

Pont-Lezica L, Bechade C, Belarif-Cantaut Y, et al. Physiological roles of microglia during development. *J Neurochem* 2011 ; 119 : 901–908.

Pop-Busui R, Marinescu V, van Huysen C, et al. Dissection of metabolic, vascular, and nerve conduction interrelationships in experimental diabetic neuropathy by cyclooxygenase inhibition and acetyl-L-carnitine administration. *Diabetes*. 2002;51(8):2619–2628.

Vinet J, Van Weering HRJ, Heinrich A, Kälin RE, Wegner A, Brouwer N, Heppner FL, Rooijen NV, Boddeke H WGM, Biber K. Neuroprotective function for ramified microglia in hippocampal excitotoxicity. *J Neuroinflammation*. 2012; 9: 27. doi: 10.1186/1742-2094-9-27.

Van Belle TL, Taylor P, von Herrath MG. Mouse models for type 1 diabetes. *Drug Discov Today Dis Models*. 2009;6:41–45.

Van Steenwinckel J, Brisorgueil MJ, Fischer J, Verge D, Gingrich JA, Bourgoin S, Hamon M, Bernard R, Conrath M (2008) Role of spinal serotonin 5-HT_{2A} receptor in 2',3'-dideoxycytidine-induced neuropathic pain in the rat and the mouse. *Pain* 137:66-80.

Virchow R. *Anatomy and Physiology*. *Br Med J*. 1858 September 25; 1(91): 805–806.

Vogt BA. Pain and Emotion Interactions in Subregions of the Cingulate Gyrus. *Nat Rev Neurosci*. 2005 July; 6(7): 533–544. doi: 10.1038/nrn1704.

Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 2005 ; 6 : 626–640.

Von Frey M. On the Use of Stimulus Hairs. 1896:71–131.

Vos BP, Strassman AM, Maciewicz RJ. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. *J Neurosci*. 1994;14:2708–2723.

Walter JT, Dizon M-J, Khodakhah K. The Functional Equivalence of Ascending and Parallel Fiber Inputs in Cerebellar Computation. *J Neurosci.*2009 ; 29(26): 8462–8473. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5718-08.2009.

Wang H, Xu H, Wu LJ, Kim SS, Chen T, Koga K, Descalzi G, Gong B, Vadakkan KI, Zhang X. et al. Identification of an adenylyl cyclase inhibitor for treating neuropathic and inflammatory pain. *Sci Transl Med.* 2011;3(65):65ra63.

Watcho P, Stavniichuk R, Ribnicky DM, Raskin I, Obrosova IG. High-Fat Diet-Induced Neuropathy of Prediabetes and Obesity: Effect of PMI-5011, an Ethanolic Extract of *Artemisia dracunculus* L. *Mediators Inflamm.* 2010; 2010: 268547. doi: 10.1155/2010/268547

Watkins LR, Hutchinson MR, Ledebor A, Wieseler-Frank J, Milligan ED, Maier SF. Norman Cousins Lecture. Glia as the "bad guys": implications for improving clinical pain control and the clinical utility of opioids. *Brain Behav Immun.* 2007 Feb; 21(2):131-46.

Wei F., Guo W., Zou S, Ren K, Dubner R .Supraspinal Glial-Neuronal Interactions Contribute to Descending Pain Facilitation. *J Neurosci.* 2008 October 15; 28(42): 10482–10495. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3593-08.2008

Woolf CJ. What is this thing called pain?.*J Clin Invest.*2010 ; 120(11): 3742–3744. doi: 10.1172/JCI45178.

Woolf CJ. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain.*Pain.* 2011;152:S2–15.

Wu MF, Pang ZP, Zhuo M, Xu ZC. Prolonged membrane potential depolarization in cingulate pyramidal cells after digit amputation in adult rats. *Mol Pain.* 2005;1:23. doi: 10.1186/1744-8069-1-23.

Xu H, Wu LJ, Wang H, Zhang X, Vadakkan KI, Kim SS, Steenland HW, Zhuo M. Presynaptic and postsynaptic amplifications of neuropathic pain in the anterior cingulate cortex. *J Neurosci.* 2008; 28(29):7445–7453. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1812-08.2008

Xu B, Descalzi G, Ye H-R, Zhuo M, and Wang Y-W. Translational investigation and treatment of neuropathic pain. *Mol Pain.* 2012; 8: 15. doi: 10.1186/1744-8069-8-15.

Yaksh TL. Future advances in pain pharmacology: what does the present say about the future? *Proc West Pharmacol Soc.* 2002;45:211–218

Yazdi-Ravandi S, Taslimi Z, Jamshidian N, Saberi H, Shams J, Haghparast A. Prediction of Quality of life by Self-Efficacy, Pain Intensity and Pain Duration in Patient with Pain Disorders. *Basic Clin Neurosci.* 2013 Spring; 4(2): 117–124.

Zarucco L, Driessen B, Scandella M, Cozzi F, Cantile C .Sensory nerve conduction and nociception in the equine lower forelimb during perineural bupivacaine infusion along the palmar nerves. *Can J Vet Res.* 2010 ;74(4): 305–313.

Zhao MG, Ko SW, Wu LJ, Toyoda H, Xu H, Quan J, Li J, Jia Y, Ren M, Xu ZC. et al. Enhanced presynaptic neurotransmitter release in the anterior cingulate cortex of mice with chronic pain. *J Neurosci.* 2006;26(35):8923–8930. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2103-06.2006.

Zhang J, De Koninck Y. Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury. *J Neurochem.* 2006 May; 97(3):772-83.

Zhang H, Yoon SY, Zhang H, Dougherty PM. Evidence that spinal astrocytes but not microglia contribute to the pathogenesis of Paclitaxel-induced painful neuropathy. *J Pain.* 2012 Mar; 13(3):293-303

Zheng FY, Xiao WH, Bennett GJ. The response of spinal microglia to chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathies is distinct from that evoked by traumatic nerve injuries. *Neuroscience*. 2011 Mar 10; 176():447-54.

Zhuo M. Cortical excitation and chronic pain. *Trends in Neurosciences*. 2008;31(4):199–207. doi: 10.1016/j.tins.2008.01.003.

Zimmermann M . Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983; 16: 109–110.

RESUME

La réponse aux traitements à la douleur neuropathique est souvent associée à de nombreux effets secondaires. Cependant, Il est nécessaire aujourd'hui d'identifier de nouvelles cibles (cellulaires et/ou moléculaires) et de nouveaux médicaments avec moins d'effets secondaires dans la prise en charge de la douleur neuropathique. *Clerodendrum formicarum* est une des plantes utilisée dans la pharmacopée africaine contre les douleurs chroniques et pourrait être l'une des pistes à explorer. L'objectif de notre travail était d'évaluer les effets de *Clerodendrum Formicarum* sur les Cellules gliales et sur la voie de signalisation de la cyclooxygénase de la corne dorsale de la moelle épinière. La douleur neuropathique était induite par une injection unique de l'alloxane monohydrate (150 mg / kg) par voie sous-cutanée chez les rats Wistars. Deux approches ont été utilisées dans cette étude : l'une comportementale et l'autre de biologie moléculaire. Le diabète est obtenu au 3e jour de l'injection de la substance chimiotoxique. La douleur neuropathique diabétique par contre est matérialisée par une allodynie mécanique et une hyperalgésie mécanique respectivement au 14^e et 21^e jour après injection de la substance chimiotoxique. Comparativement à la prégabaline (10 mg/ kg) ; les extraits de feuilles de *Clerodendrum formicarum* (ECF) ont supprimé aussi l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie mécanique de manière dépendante de la dose par un mécanisme d'inhibition centrale de l'expression de CD11b et de GFAP. Enfin, les ECF ont inhibé les Cox1 et Cox2 de manière dépendante de la dose. L'ensemble de ces données confirment une alternative possible aux traitements de la douleur neuropathique.

Mots clés : Douleur Neuropathique, Diabète, cellules gliales, cyclooxygénase, *Clerodendrum formicarum*.

ABSTRACT

The response to treatment of neuropathic pain is often associated with numerous side effects. However, it is now necessary to identify new targets (cellular and / or molecular) and new drugs with fewer side effects in the treatment of neuropathic pain. *Clerodendrum formicarum* is a plant used in African pharmacopoeia against chronic pain and could be one of the track to explore. The aim of our study was to evaluate the effects of *Clerodendrum formicarum* on glial cells and the signaling pathway of cyclooxygenase of the dorsal horn of the spinal cord. Neuropathic pain was induced by a single injection of alloxan monohydrate (150 mg / kg) by subcutaneous injection in Wistar rats. Two approaches were used in this study: a behavioral and other molecular biology. Diabetes is obtained in the 3rd day of the injection of the chemotoxic substance. Diabetic neuropathic pain is materialized by against mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia respectively at the 14th and 21st day after injection of the chemotoxic substance. Compared to pregabalin (10mg / kg); *Clerodendrum formicarum* leaf extracts (ECF) also suppressed mechanical allodynia and mechanical hyperalgesia dependent manner of the dose by a central mechanism of inhibition of the expression of CD11b and GFAP. Finally, ECF inhibited the Cox1 and Cox2 of dose-dependent manner. All these data confirm a possible alternative treatment of neuropathic pain.

Keywords: Neuropathic Pain, Diabetes, Glial cells, Cyclooxygenase, *Clerodendrum formicarum*.