



HAL
open science

Neuroinflammation spinale et rôle de la voie JAK/STAT3 dans les douleurs neuropathiques chez le rat

Elisa Dominguez y Salmeron

► **To cite this version:**

Elisa Dominguez y Salmeron. Neuroinflammation spinale et rôle de la voie JAK/STAT3 dans les douleurs neuropathiques chez le rat. Neurosciences. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2009. Français. NNT : 2009PA066039 . tel-00813382

HAL Id: tel-00813382

<https://theses.hal.science/tel-00813382>

Submitted on 15 Apr 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THÈSE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité : NEUROSCIENCES

Présentée par :
Mlle Elisa Dominguez y Salmeron

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

**Neuroinflammation spinale et rôle de la voie JAK/STAT3 dans les
douleurs neuropathiques chez le rat**

Soutenue le 7 mai 2009

Devant le jury composé de :

Docteur Isabelle Decosterd
Professeur Jean Valmier
Professeur Didier Orsal
Docteur Anne Baron-Van Evercooren
Professeur Marc Landry
Docteur Michel Pohl

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de Thèse

A mon grand-père René,

« Vous savez ce que c'est que la recherche : on part sur une question et on trouve en cours de route des faits qui vous en posent une autre. »

Philippe Meyer, Sociologue et journaliste français

Je prie monsieur le professeur Didier Orsal d'agréer l'expression de ma respectueuse gratitude pour l'honneur qu'il me fait en présidant le jury de cette thèse.

Je remercie mesdames les Drs. Isabelle Decosterd et Anne Baron-Van Evercooren et messieurs les Prs. Jean Valmier et Marc Landry. Connaissant leurs travaux et leurs compétences, je suis particulièrement honorée qu'ils aient accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Merci au Dr. Jean-Jacques Benoliel de m'avoir permise de préparer cette thèse au sein de son laboratoire. Ses judicieux conseils ont participé au bon déroulement de ma thèse.

Que le Dr. Michel Pohl, mon directeur de thèse, reçoive toute ma reconnaissance pour m'avoir accueillie dans son équipe et m'avoir permis d'acquérir une multitude de compétences. Je tiens tout particulièrement à le remercier pour sa disponibilité, sa confiance et sa patience à mon égard. Il a su toujours être présent et efficace même lors des moments difficiles.

Mes remerciements vont également à mes collègues et amis Annie Mauborgne et Cyril Rivat dont le travail et les compétences, mais également la bonne humeur et la gentillesse, ont permis la réalisation de ce travail de thèse.

Un grand merci aussi à Alice Meunier pour m'avoir guidée notamment dans l'apprentissage de la technique d'injection dans la moelle épinière et également, à Stéphanie Philippe et Mathieu Desclaux pour l'enseignement de la production des vecteurs lentiviraux. Tous trois ont contribué à ce travail de thèse.

Je remercie spécialement mes amies et collègues Adeline, Aurélie, Brigitte et Blandine pour leur sympathique contribution au bon déroulement de cette thèse. Merci également à l'ensemble des collègues des unités 713 et 677 que je côtoie depuis 6 ans maintenant.

Merci aussi à tous nos compagnons de travail à poils blancs, cette étude (et la recherche) n'aurait pas été possible sans eux.

Pour leurs encouragements et leur assistance aussi bien matérielle que morale qui m'ont permis de faire cette thèse dans de bonnes conditions, je remercie chaudement mes parents, mes grands-parents ainsi que la famille Garnier.

Ces remerciements ne seraient pas complets si j'oubliais de remercier profondément celui qui partage ma vie depuis quelques années déjà. Merci Camille d'avoir été mon plus fidèle supporter pendant ces 4 années de thèse.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-HT	5-hydroxytryptamine ou sérotonine
AAV	Virus associé à l'adénovirus
AMPA	Acide aminométhylphosphonique
ATF3	<i>Activating transcription factor 3</i>
ATP	Adénosine triphosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
BDNF	<i>Brain-derived growth factor</i>
CaMK	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinases
CCI	<i>Chronic constriction injury</i> (ligature lâche du nerf sciatique)
CCK	Cholécystokinine
CGRP	<i>Calcitonin gene-related peptide</i>
CIDN	Contrôles inhibiteurs diffus induits par une stimulation nociceptive
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
CNTF	<i>Ciliary Neurotrophic Factor</i>
COX	Cyclo-oxygénase
DREZ	<i>Dorsal root entry zone</i>
DSM	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
Epo	Erythropoïétine
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ESS	<i>Extended SH2 subdomains</i>
FAP	Fibres afférentes primaires
FRB	Formation réticulée bulbaire
GABA	Acide gamma amino-butyrique
GAP 43	<i>Growth associated protein 43</i>
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GLAST	<i>Glutamate aspartate transporter</i>
GLT-1	<i>Glutamate transporter 1</i>
Grb2	<i>Growth factor receptor binding protein 2</i>
GRD	Ganglion de la racine dorsale
HSP	<i>Heat shock protein</i>
HSV	<i>Herpes simplex virus</i>
IASP	<i>International association for the study of pain</i>
IB4	Isolectine B4
Iba1	<i>Ionized calcium binding adaptor molecule 1</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN	Interféron
IL	Interleukine
iNOS	<i>Nitric oxide synthase</i> inductible

IR	Immunoréactivité
ITGAM (cd11b)	Intégrine α M, un des marqueurs de l'activation microgliale
JAK	<i>Janus activated kinases</i>
JNK	<i>C-Jun-N-terminal kinase</i>
KCC2	KCl co-transporteur de type 2
KIR	<i>Kinase inhibitory region</i>
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
LV	<i>Lentiviral vector</i>
MAP1S	<i>Microtubule-associated protein 1S</i>
MAP2	<i>Microtubule-associated protein 2</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1 (CCL2)	<i>Monocyte chemotactic protein-1 (Chemokine ligand 2)</i>
MIP-1α	<i>Macrophage inflammatory protein 1 alpha</i>
NA	Noradrénaline
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NK	Récepteur à la neurokinine
NKCC1	Co-transporteur Na-K-Cl
NMDA	N-methyl D-aspartate
nNOS	<i>Nitric oxide synthase neuronale</i>
NNT	<i>Number needed to treat</i>
NO	Monoxyde d'azote
NPY	Neuropeptide Y
NRM	Noyau raphé magnus
ORL-1	<i>Opiate receptor-like 1</i>
OSM	Oncostatine M
PG	Prostaglandine
PIAS	<i>Protein inhibitor of activated STATs</i>
PIP2	Phosphatidylinositol bisphosphate
PK	Protéine kinase
pSTAT3	Forme phosphorylée (active) de la protéine STAT3
RBRV	Région bulbaire rostro-ventrale
rSV40	<i>Recombinant Simien Virus 40</i>
SCI	<i>Spinal cord injury</i>
SGPA	Substance grise péri-aqueducale
SH2	<i>Src homology 2</i>
SHP	<i>SH2-containing phosphatases</i>
SIDA	Syndrôme d'immuno-déficience acquise
SIRP1α	<i>Signal regulatory protein 1a</i>
SNC	Système nerveux central
SNI	<i>Spared Nerve Injury</i>
SNL	<i>Spinal Nerve Ligation</i> (ligature serrée des nerfs spinaux L5 et L6)
SNT	<i>Sciatic Nerve Transection</i> (section complète du nerf sciatique)
SOCS	<i>Suppressors of cytokine signaling</i>

SOCS3-V5	Protéine transgénique SOCS3 + séquence tag V5
Sos	<i>Son of Sevenless</i> , facteur d'échange de GTP pour Ras
SST-R	Récepteur à la somatostatine
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TENS	<i>Transcutaneous electrical nerve stimulation</i>
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TNFα	Facteur de nécrose tumorale alpha
TRPM8	Récepteur au menthol 8
TRPV1	Récepteur vanilloïde 1
UTP	Uridine triphosphate
VIP	<i>Vasointestinal peptide</i>
VSV-G	Glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculaire

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS	5
TABLE DES MATIÈRES	8
BIBLIOGRAPHIE PERSONNELLE	12
INTRODUCTION GÉNÉRALE	13
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	16
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION À LA DOULEUR	18
1 Définition.....	17
2 Les composantes de la douleur.....	17
2.1 La nociception.....	17
2.2 La perception de la douleur.....	18
2.3 La souffrance.....	18
2.4 Les comportements associés à la douleur	19
3 Les différents types de douleurs.....	19
3.1 La douleur passagère.....	19
3.2 La douleur aiguë.....	19
3.3 La douleur chronique	20
4 Les douleurs chroniques	20
4.1 Les types de douleurs chroniques.....	20
4.1.1 Inflammatoires	20
4.1.2 Cancéreuses.....	21
4.1.3 Neuropathiques.....	21
4.2 Manifestations comportementales associées aux douleurs neuropathiques.....	21
4.3 Les traitements actuellement disponibles.....	22
4.3.1 Traitements médicamenteux	22
4.3.1.1 Antidépresseurs tricycliques	22
4.3.1.2 Anticonvulsivants et anti-épileptiques	22
4.3.1.3 Analgésiques morphiniques	23
4.3.1.4 Blocs	23
4.3.2 Traitements non médicamenteux	23
4.3.2.1 Sections chirurgicales.....	23
4.3.2.2 Neurostimulation.....	23

4.3.2.3	Kinésithérapie/Relaxation	24
CHAPITRE 2 : BASES PHYSIOPATHOLOGIQUES DES DOULEURS		
NEUROPATHIQUES		
1	Voies de transmission de la douleur : fonctionnement physiologique.....	27
1.1	Mécanismes périphériques de la nociception.....	27
1.1.1	Les nocicepteurs.....	27
1.1.2	Les médiateurs périphériques.....	29
1.2	Mécanismes spinaux de la nociception	31
1.2.1	Projections des fibres afférentes primaires.....	31
1.2.2	La première synapse.....	31
1.2.3	Les différents types de neurones post-synaptiques ou spinaux.....	33
1.2.4	Structures supra-spinales impliquées dans la nociception	35
1.3	Mécanismes de contrôle de la nociception.....	37
1.3.1	Les contrôles segmentaires spinaux	37
1.3.2	Les contrôles supra-spinaux inhibiteurs descendants.....	37
1.3.3	Les contrôles supra-spinaux facilitateurs	39
1.3.4	Les contrôles inhibiteurs diffus induits par une stimulation nociceptive (CIDN)	39
2	Transmission du message nociceptif lors des douleurs neuropathiques	41
2.1	Mécanismes neuronaux	41
2.1.1	À la périphérie.....	41
2.1.1.1	Sensibilisation périphérique	43
2.1.1.2	Activité ectopique	43
2.1.2	Modifications spinales.....	44
2.1.2.1	Sprouting.....	44
2.1.2.2	Wind-up.....	45
2.1.2.3	Sensibilisation centrale.....	46
2.1.2.4	Perte de l'inhibition (Desinhibition)	47
2.1.3	Modifications supra-spinales.....	48
2.2	Contribution des cellules immunitaires et gliales	48
2.2.1	À la périphérie.....	49
2.2.2	Dans la moelle épinière	51
2.2.2.1	Les cellules microgliales	52

2.2.2.2	Les astrocytes	57
2.2.2.3	Les facteurs potentiellement responsables de l'activation gliale	63
2.3	Implication des cytokines pro-inflammatoires	65
2.3.1	Le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α)	66
2.3.2	L'interleukine 1 β (IL-1 β)	68
2.3.3	L'interleukine 6 (IL-6)	69
CHAPITRE 3 : VOIE DE SIGNALISATION JAK/STAT3		73
1	Fonctionnement de la voie JAK/STAT3.....	73
1.1	Les activateurs potentiels de la voie.....	73
1.2	L'activation de la voie.....	75
1.3	La désactivation de la voie	78
2	L'inhibiteur endogène SOCS3	82
2.1	Structure et mode d'action	82
2.2	Contrôle des effets biologiques de l'IL-6.....	86
OBJECTIFS DE L'ÉTUDE		89
RÉSULTATS		91
Article 1		93
Article 2		111
DISCUSSION GÉNÉRALE		145
1	Pertinence de la méthode utilisée.....	145
1.1	Les modèles animaux de douleurs neuropathiques	146
1.1.1	Les recommandations éthiques	146
1.1.2	Les différents modèles animaux de douleurs neuropathiques.....	147
1.1.3	Les relations entre les modèles animaux et les pathologies existantes chez l'Homme	151
1.1.4	La prise en compte de ces contraintes dans notre étude.....	152
1.2	La technique d'injection intraparenchymale combinée à l'utilisation du vecteur lentiviral LV-SOCS3-V5.....	154
1.2.1	Le choix du vecteur LV-SOCS3-V5	154
1.2.2	Mode d'administration	156

2 Implication de la voie de signalisation JAK/STAT3 dans les lésions médullaires et périphériques	159
2.1 La voie JAK/STAT3 est activée, à différents niveaux, après lésion de nerf périphérique.....	159
2.1.1 Activation de la voie JAK/STAT3 dans le nerf, les GRD lésés et la moelle épinière ventrale	159
2.1.2 Activation de la voie JAK/STAT3 dans la moelle épinière dorsale	161
2.2 La voie JAK/STAT3 est activée après lésion de la moelle épinière	163
2.3 Les effecteurs potentiels de la voie JAK/STAT3	164
2.4 Perspectives de l'étude	165
2.4.1 Évaluation du rôle de la voie JAK/STAT3 activée dans les GRD dans l'hypersensibilité douloureuse.....	165
2.4.2 Contribution potentielle des gangliosides à l'activation de la voie JAK/STAT3 spinale	167
 CONCLUSION GÉNÉRALE	169
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	171

BIBLIOGRAPHIE PERSONNELLE

Dominguez E., Rivat C., Pommier B., Mauborgne A., Pohl M. JAK/STAT3 pathway is activated in spinal cord microglia after peripheral nerve injury and contributes to neuropathic pain development in rat. *J. Neurochem* 107, 50-60.

Dominguez E., Meunier A., and Pohl M. Gene-based approaches for the therapy of pathological pain. *Methods in Molecular Biology : Analgesia*, Edited by : A. Szalasi © Humana press inc. Totowa, NJ.

Meunier A., Latrémolière A., Dominguez E., Mauborgne A., Philippe S., Hamon M., Mallet J., Benoliel J. J. and Pohl M. (2007) Lentiviral-mediated Targeted NF-kappaB Blockade in Dorsal Spinal Cord Glia Attenuates Sciatic Nerve Injury-induced Neuropathic Pain in the Rat. *Mol Ther* 15, 687-697.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les douleurs chroniques, douleurs qui persistent au delà de 3 mois, peuvent apparaître notamment après lésion de nerf périphérique et sont particulièrement invalidantes pour le patient. Qualifiées de douleurs neuropathiques, elles sont associées aux phénomènes d'allodynie (réponse douloureuse à une stimulation non nociceptive), d'hyperalgésie (réponse exagérée à un stimulus douloureux) et peuvent également survenir en l'absence de stimulation. Bien que les cliniciens peuvent proposer certains traitements pour soulager ces douleurs, la prise en charge clinique reste problématique et les patients restent trop souvent en échec thérapeutique.

Les études réalisées à l'aide de modèles animaux qui reproduisent, du moins en partie, ces pathologies ont permis d'élucider un certain nombre des mécanismes qui conduisent à l'apparition des douleurs neuropathiques. Ces douleurs sont souvent associées à des altérations des voies de transmission du message nociceptif aussi bien au niveau périphérique que central. Les neurones impliqués dans la propagation de l'influx douloureux, qu'ils soient eux-mêmes lésés ou non, subissent des modifications phénotypiques aboutissant à leur hyperexcitabilité. En dehors de ces phénomènes neuronaux, les cellules immunitaires et gliales contribuent aussi au développement des douleurs chroniques aux niveaux périphérique, spinal et supra-spinal. Dans la moelle épinière plus particulièrement, les cellules gliales (astrocytes et microglie), longtemps considérées comme de simples cellules de soutien, participent de façon considérable à la mise en place des douleurs neuropathiques. En plus des neurones, elles vont produire et libérer des médiateurs inflammatoires et/ou algogènes dans la moelle épinière perpétuant l'activation gliale et participant à l'hyperexcitabilité neuronale. Les cytokines pro-inflammatoires, dont le rôle pro-nociceptif a été clairement démontré, font partie des molécules libérées dans la moelle épinière et peuvent agir au travers de récepteurs spécifiques sur les neurones, la microglie ou les astrocytes présents. L'une d'entre elles, l'interleukine 6 (IL-6), via le récepteur IL-6R α et la sous-unité gp130, met en jeu de façon prépondérante la voie de signalisation JAK/STAT3.

Partant du rôle globalement pro-nociceptif qu'exerce l'IL-6, nous nous sommes interrogés sur le rôle dans la moelle épinière de sa principale voie de signalisation, la voie JAK/STAT3, dans la mise en place du contexte inflammatoire et dans l'apparition des douleurs chroniques après lésion de nerf périphérique chez le rat. Pour tenter de répondre à cette question, nous avons exploré la mise en jeu éventuelle de cette voie de transduction dans différents modèles de lésion de nerf périphérique chez le rat : un modèle purement lésionnel, la section complète du

nerf sciatique (SNT) puis deux modèles validés de douleurs neuropathiques, la ligature serrée des nerfs spinaux L5 et L6 (SNL) et la ligature lâche du nerf sciatique (CCI). Nous avons réalisé une étude multidisciplinaire combinant des techniques classiques de biochimie, de biologie moléculaire, des approches de transfert ciblé de gènes et les études comportementales chez l'animal. Ainsi, l'immunohistochimie, le western-blot et la RT-PCR semi-quantitative en temps réel ont été utilisés pour caractériser l'état d'activation de la voie JAK/STAT3 et identifier les types cellulaires concernés. Afin d'évaluer la contribution de cette voie à l'activation gliale et au développement de la douleur chronique, nous avons d'abord tenté d'inhiber l'activité de la voie JAK/STAT3 par injection intrathécale d'un agent pharmacologique, puis nous avons mis en œuvre une approche plus ciblée et plus spécifique à l'aide de transfert de gènes par vecteur viral.

Nous consacrerons une première partie aux rappels bibliographiques concernant la définition de la douleur et ses différents types en développant plus particulièrement les douleurs chroniques de type neuropathique. Ensuite, après un bref rappel de la transmission du message nociceptif dans les conditions physiologiques, nous aborderons certains aspects des altérations des voies de la douleur après lésion de nerf périphérique, en soulignant l'implication des cellules gliales et des cytokines pro-inflammatoires. Enfin, nous détaillerons le fonctionnement de la voie de signalisation JAK/STAT3 et sa régulation notamment par la protéine SOCS3.

La deuxième partie de ce manuscrit présentera les résultats obtenus sous la forme de deux articles portant sur :

- (1) la caractérisation de l'activation de la voie JAK/STAT3 dans les modèles SNT et SNL et l'étude de l'impact de son inhibition par un agent pharmacologique administré par voie intrathécale sur le comportement douloureux après SNL et,
- (2) le développement d'un vecteur lentiviral produisant la protéine transgénique SOCS3 et l'évaluation de sa capacité à inhiber localement et de façon ciblée la voie JAK/STAT3 dans la moelle épinière de rats CCI ; puis du retentissement d'un tel traitement sur l'expression de certains gènes d'intérêt et sur l'hypersensibilité douloureuse.

Dans la troisième partie de ce mémoire, nous évaluerons la pertinence des modèles animaux et des approches expérimentales utilisées pour cette étude. D'autre part, nous aborderons certaines données qui mettent en évidence l'importance de l'activation de la voie JAK/STAT3 dans différents types de lésion du système nerveux. Enfin, nous terminerons ce manuscrit en évoquant les éventuelles perspectives de recherches qui s'appuient sur les données bibliographiques très récentes et sur les résultats de notre travail.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION À LA DOULEUR

La douleur, expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, demeure un signal d'alarme utile pour le maintien de l'intégrité de l'organisme. Cependant, si la douleur perdure au delà de 3 mois, on parle de douleur chronique. La douleur devient alors un véritable syndrome, qui ne protège pas mais diminue l'individu.

Les douleurs chroniques de type neuropathique, liées à la lésion du système nerveux, restent les plus difficiles à traiter car elles répondent peu aux antalgiques habituels. Malgré certains traitements comme les anti-dépresseurs tricycliques, la majorité des patients atteints (~1% de la population) reste souvent mal soignée car les traitements sont mal adaptés.

Afin de développer de nouveaux traitements plus efficaces et plus ciblés, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la genèse de ce type de douleur.

1 Définition

Le mot « douleur » renvoie à une expérience consciente associée à une lésion ou une maladie, mais est également utilisé pour décrire l'inconfort suscité par un sentiment désagréable. Ces différentes circonstances sont à la base d'une longue incertitude concernant la façon de concevoir la douleur et ses mécanismes. Les travaux et les réflexions des deux siècles passés ont permis de proposer que la douleur est à la fois une sensation spécifique et une émotion.

Actuellement, la définition de la douleur formulée par le comité de taxonomie de l'IASP (*International Association for the Study of Pain*, société internationale pour l'étude de la douleur), société qui rassemble les chercheurs et les cliniciens travaillant sur ce sujet, met en évidence ces différentes caractéristiques de la douleur : « La douleur est une sensation désagréable et une expérience émotionnelle associées à une lésion tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite en ces termes ». L'existence de différents types de douleurs peut être expliquée par l'identification de quatre composantes principales de la douleur : la nociception, la perception de la douleur, la souffrance et les comportements associés à la douleur (Loeser and Melzack, 1999).

2 Les composantes de la douleur

2.1 La nociception

Le terme « nociception » fut utilisé pour la première fois par Sherrington en 1906 pour définir la signalisation des événements douloureux par les organes sensoriels responsables de la douleur. En effet, la détection d'une lésion tissulaire résulte de l'activation de transducteurs spécialisés (nocicepteurs A δ et C). Ces nocicepteurs peuvent être stimulés, entre autres, par la

production au site de la lésion de substances inflammatoires. Les substances ainsi que les mécanismes d'activation de ces nocicepteurs seront décrits plus amplement au chapitre 2, 1.

La nociception renvoie à la composante purement sensorielle de la douleur. Cependant, nous avons vu que le concept de douleur reste indissociable du domaine des émotions présent dans les autres composantes de la douleur. L'aspect émotionnel de la douleur peut être décomposé, comme toute émotion, en deux éléments : une composante physiologique, dont les structures hypothalamiques sont les principaux effecteurs, et qui peut être objectivable et quantifiable (même chez l'animal) et un versant subjectif, le ressenti, qui nécessite un accès à un report verbal, et n'est, par conséquent, applicable qu'à l'Homme.

2.2 La perception de la douleur

Elle peut être déclenchée par un stimulus douloureux, une lésion ou une maladie qui peuvent sensibiliser les nocicepteurs. La perception douloureuse résulte de la discrimination sensorielle de l'information transmise par les nocicepteurs afin de générer une réponse adéquate. Toutefois, la douleur chez l'Homme n'est pas seulement la conséquence d'une stimulation sensorielle. En effet, la douleur peut apparaître en l'absence de lésions (donc de nociception). La perception douloureuse devient alors pathologique car déclenchée de façon inadéquate par rapport au stimulus externe.

2.3 La souffrance

La souffrance est une réponse négative déclenchée aussi bien par la douleur que par la peur, l'anxiété, le stress, la perte de personnes proches ou tout autre état psychologique. La souffrance peut en effet survenir quand l'intégrité physique ou psychologique de la personne est menacée. Dans le cas des douleurs chroniques neuropathiques abordées dans ce mémoire, la souffrance vécue par les patients est à ce point telle que ces derniers peuvent passer par des épisodes dépressifs voire suicidaires. Il existe effectivement une co-morbidité entre les troubles anxio-dépressifs et les douleurs chroniques bien établie (Blackburn-Munro and Blackburn-Munro, 2001; Delgado, 2004; Gureje, 2008). Cette relation s'explique notamment en considérant que la douleur chronique constitue un stress chronique pouvant évoluer vers les pathologies anxio-dépressives. D'autre part, un état anxio-dépressif peut accroître la douleur ressentie par les patients. D'ailleurs, la plainte douloureuse fait partie des items du

Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM) IV définissant l'anxiété généralisée ou la dépression.

2.4 Les comportements associés à la douleur

Il s'agit de la réaction d'un individu face à la perception douloureuse et à l'éventuelle souffrance qui peut lui être associée. Ce comportement peut être observable et quantifiable par autrui. Chez l'animal, outre les tests comportementaux spécifiques de la douleur évoquée, les comportements spontanés tels que l'évitement ou la prostration permettent d'apprécier la réponse à la douleur de ces animaux. Chez l'Homme, le report verbal donne accès à davantage d'informations comme le ressenti de l'individu. Celui-ci est fonction du vécu, du contexte de vie et de la culture de l'individu. Les comportements associés à la douleur peuvent alors se traduire par l'expression d'une plainte douloureuse jusqu'à la recherche d'une aide médicale.

3 Les différents types de douleurs

La classification des types de douleurs proposée dans ce mémoire est basée sur le rôle fondamental du paramètre temps dans la douleur. En effet, il convient de distinguer des douleurs passagères, aiguës et chroniques.

3.1 La douleur passagère

Elle est déclenchée par l'activation des nocicepteurs en absence de lésion tissulaire. Son rôle est de protéger l'individu de stimulations qui pourraient menacer l'intégrité de son organisme. Ce type de douleur est observé dans la vie de tous les jours et fait rarement l'objet d'une recherche d'aide médicale.

3.2 La douleur aiguë

La douleur aiguë est déclenchée lors d'une lésion tissulaire. Tout comme la douleur passagère, son rôle vise à protéger l'organisme. L'activation des nocicepteurs au site de la lésion par des composés inflammatoires altèrent leurs réponses et leurs connexions centrales. Cependant, l'organisme est tout à fait capable de restaurer son intégrité par lui-même. Toutefois, un recours à une aide médicale peut permettre de prévenir ou de diminuer la

perception douloureuse, d'accélérer les processus de réparation en limitant l'atteinte éventuelle d'autres tissus.

Les douleurs post-traumatiques après un accident ou une intervention chirurgicale sont quelques exemples de douleurs aiguës.

3.3 La douleur chronique

On parle de douleur chronique si la douleur perdure au-delà de 3 mois. Elle est déclenchée par une lésion ou une maladie et peut être perpétuée par d'autres facteurs différents de ceux impliqués dans la douleur. Une des caractéristiques fondamentales observées dans ce type de douleur est que les mécanismes endogènes de « guérison » sont incapables de restaurer l'homéostasie du corps.

Alors que douleur passagère et douleur aiguë peuvent être considérées comme des douleurs symptômes, c'est-à-dire un signal d'alarme utile, la douleur chronique est une douleur syndrome persistante au cours du temps. Ce type de douleur est inutile et délétère car il ne protège pas l'individu mais le diminue. Tous les types de douleurs chroniques conduisent les patients à chercher une aide médicale, mais, soulignons-le, la prise en charge de certains types de douleurs pathologiques est insuffisante et se traduit le plus souvent par un échec thérapeutique. On estime qu'environ un sixième de la population souffre de douleurs chroniques.

4 Les douleurs chroniques

Une douleur chronique n'est pas une douleur aiguë qui se prolonge dans le temps. En effet, la douleur chronique est le résultat d'une neuroplasticité, c'est-à-dire d'un changement d'activité neuronale et de la connectivité du réseau de neurones. En raison de cette neuroplasticité moléculaire et morphologique, le prolongement dans le temps de la stimulation nociceptive entraîne une modification de la réactivité synaptique. Suivant la cause des douleurs chroniques, on peut définir différents types de douleurs chroniques : inflammatoires, cancéreuses ou bien neuropathiques.

4.1 Les types de douleurs chroniques

4.1.1 Inflammatoires

La douleur chronique est souvent associée au développement de maladies inflammatoires. La persistance de l'agent causal n'est pas déterminante dans le passage à la chronicité mais c'est

davantage la perpétuation d'un déséquilibre entre facteurs qui peut modifier la réponse immunitaire. La polyarthrite rhumatoïde ou l'arthrite sont les exemples les plus connus de pathologies inflammatoires associées aux douleurs chroniques.

4.1.2 Cancéreuses

Les douleurs cancéreuses sont des douleurs mixtes associant à la fois une composante neuropathique et une composante inflammatoire. Elles sont liées à la progression de certaines tumeurs qui provoquent une compression du système nerveux et/ou une inflammation locale, ou dans le cas des cancers osseux, à la destruction du tissu osseux. Il existe également un risque de neuropathie périphérique avec certains antitumoraux. Il s'agit surtout des interférons, des taxanes, des dérivés du platine (surtout le cisplatine, l'oxaliplatine) et des alcaloïdes de la pervenche (vincristine). Les neuropathies induites par la chimiothérapie sont dépendantes de la dose totale cumulée et apparaissent souvent quelques semaines après l'instauration du traitement. Les traitements des tumeurs par radiothérapie peuvent également conduire au développement de douleurs.

4.1.3 Neuropathiques

Les douleurs neuropathiques (ou neurogènes) sont des douleurs chroniques consécutives à une atteinte du système nerveux central (cerveau, moelle épinière) ou périphérique (nerfs, racines...). Elles surviennent en l'absence de stimulation douloureuse. Elles sont fréquentes (1% de la population) et représentent 30 à 40% des consultations dans les centres d'évaluation et de traitement de la douleur. Ce mémoire traitera uniquement de ce type de douleur. Parmi les exemples, on peut citer les fibromyalgies, les douleurs post-herpétiques, les douleurs de dos, les douleurs post-zostériennes, les neuropathies, les douleurs associées au diabète, à la sclérose en plaques, à l'AVC, au SIDA, aux lésions traumatiques (arrachement nerveux) et aux syndromes canaux.

4.2 Manifestations comportementales associées aux douleurs neuropathiques

Quel que soit le site de la lésion et sa cause, les douleurs neuropathiques ont des caractères communs. Ce sont des douleurs spontanées qui peuvent se manifester sans stimulation. On retrouve un « fond douloureux » décrit souvent par le patient comme une brûlure, une impression d'étau, d'arrachement, de piqûre, de morsure, de troubles de la sensibilité, sur lequel se greffent des accès paroxystiques de douleur fulgurante à type de décharges électriques, d'élanement ou d'accentuation du fond douloureux. La douleur peut être à type

d'hyperalgésie (réponse exagérée à un stimulus douloureux) ou d'allodynie (des stimulations non douloureuses comme une caresse ou un contact chaud deviennent douloureuses). Des troubles « sympathiques » peuvent être aussi associés (œdème, hypersudation...).

La douleur neuropathique est souvent aggravée par l'activité (pire en fin de journée), la fatigue ou la tension nerveuse. En plus de la douleur, le patient peut ressentir des paresthésies (fourmillements, désagréables ou non), un prurit (démangeaison), des impressions diverses (sensations d'insecte rampant sur la peau...). Les conséquences psychologiques sont importantes : anxiété, irritabilité, isolement social voire syndrome dépressif. Ces douleurs peuvent être amplifiées ou atténuées par l'humeur du patient : un syndrome dépressif accentuera la douleur neuropathique, un moment de détente pourra la calmer.

4.3 Les traitements actuellement disponibles

La prise en charge des douleurs neuropathiques reste difficile car certaines d'entre elles ne répondent que peu aux antalgiques habituels.

4.3.1 Traitements médicamenteux

4.3.1.1 Antidépresseurs tricycliques

Ce sont les premiers médicaments dont l'efficacité a été démontrée dans les douleurs neuropathiques de différents types. Ils sont actifs sur le fond douloureux permanent. Leur effet antalgique est indépendant de leur effet antidépresseur. La participation de la sérotonine et de la noradrénaline dans les mécanismes de l'analgésie (chapitre 2, 1.3.2) permet de comprendre leur efficacité analgésique spécifique.

Exemple : amitriptyline, clomipramine, imipramine, doxépine

4.3.1.2 Anticonvulsivants et anti-épileptiques

Ils sont indiqués dans la composante fulgurante des douleurs neuropathiques périphériques et/ou centrales.

Exemple : gabapentine, prégabaline, carbamazépine

4.3.1.3 Analgésiques morphiniques

Ils peuvent être utilisés pour les douleurs neuropathiques de différents types avec toutefois un risque d'effets indésirables (sédation, constipation, nausées...) et, surtout, du développement à long terme d'une tolérance et d'une dépendance.

Exemple : morphine, fentanyl, tramadol

L'association de plusieurs de ces médicaments (gabapentine et morphine) peut permettre d'obtenir un effet antalgique plus prononcé que si ces deux substances étaient administrées seules. Cependant, l'incidence de certains effets indésirables peut être accrue.

4.3.1.4 Blocs

Les blocs sont des injections de substances pharmacologiques (anesthésiques locaux, corticoïdes, opioïdes ...) au niveau du nerf, de la zone cutanée douloureuse, voire de la moelle épinière.

4.3.2 Traitements non médicamenteux

4.3.2.1 Sections chirurgicales

Dans certains cas, une intervention chirurgicale peut être envisagée : il s'agit d'une DREZotomie, qui consiste en une section sélective des fibres qui conduisent l'information douloureuse, au niveau de la moelle épinière. La solution la plus destructive, c'est-à-dire la section du nerf, n'est pratiquée qu'en de très rares cas.

4.3.2.2 Neurostimulation

Deux types de neurostimulations sont réalisables : transcutanée ou centrale. La neurostimulation transcutanée a pour but de renforcer ou de suppléer un mécanisme inhibiteur défaillant. C'est une méthode non invasive, d'une grande simplicité, et du fait de la miniaturisation des appareils, elle donne au patient la possibilité d'ajuster les paramètres de stimulation. L'effet attendu de la neurostimulation transcutanée est le masquage de la douleur par la sensation produite par l'appareil pendant le passage du courant. Cet effet de masquage peut se prolonger après l'arrêt de l'appareil. On parlera alors d'un post-effet, qui permettra de déterminer le rythme et la durée de séances.

Basées sur les mêmes principes que la neurostimulation transcutanée, il existe des méthodes neurochirurgicales d'analgésie par implantation d'électrodes au niveau médullaire (en arrière des cordons postérieurs de la moelle épinière) ou thalamique. Ces méthodes plus invasives

que la neurostimulation transcutanée obligent à une sélection rigoureuse des patients tant au niveau de l'étiologie de la douleur que de leur profil psychologique.

4.3.2.3 Kinésithérapie/Relaxation

La mise en place d'une activité physique régulière dans le cadre d'une kinésithérapie peut distraire et soulager le patient, mais aussi entretenir l'appareil musculaire. Les techniques de relaxation peuvent apprendre au patient à se détendre et à mieux tolérer les douleurs.

Le *Number Needed to Treat* (NNT) représente l'effort thérapeutique requis pour obtenir un bénéfice clinique précis et est défini comme « le nombre de personnes à traiter avec un traitement A pour guérir ou pour prévenir un cas supplémentaire de la pathologie considérée par rapport au traitement B ». Cet indice est de plus en plus souvent utilisé pour des études évaluant l'efficacité d'un traitement de la douleur et pour comparer l'efficacité des traitements entre eux. Plus le NNT est grand, plus la différence entre deux traitements comparés est faible. Le NNT nécessaire pour avoir 1 patient, à moitié soulagé varie de 1,7 à 10 suivant les traitements disponibles pour les douleurs neuropathiques (Sindrup and Jensen, 1999). Cette différence révèle le manque d'efficacité des analgésiques administrés de manière empirique dont les molécules-cibles ne sont pas toujours impliquées dans la pathologie douloureuse chez un patient donné. De plus, il faut souligner que les mécanismes d'actions de ces traitements médicamenteux restent encore mal connus.

Afin de développer de nouveaux traitements plus efficaces et plus ciblés, il est nécessaire de progresser dans la compréhension des mécanismes impliqués dans l'induction de la douleur et dans son maintien.

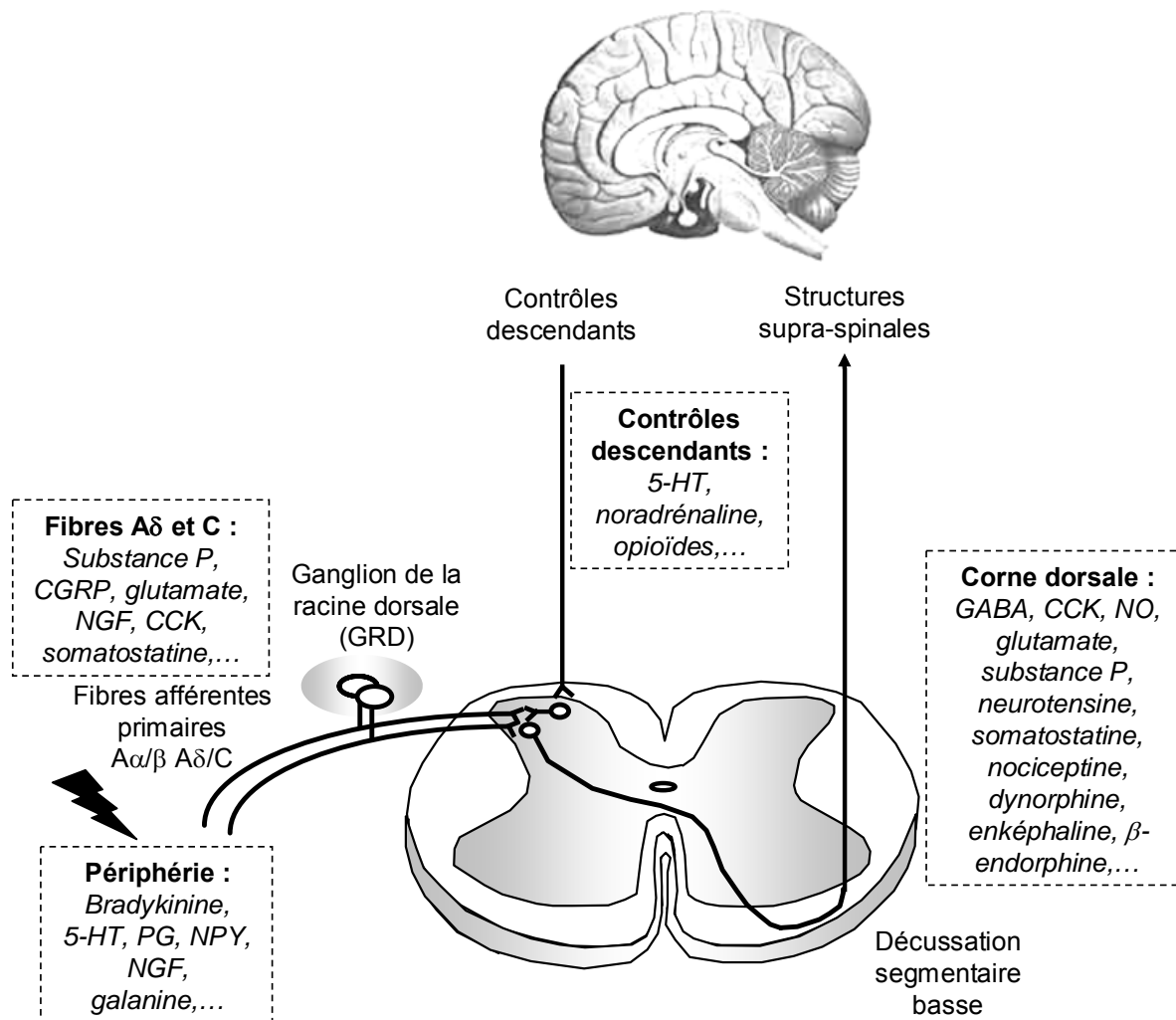


Figure 1 : Voies de transmission du message nociceptif.

Le stimulus douloureux déclenche à la périphérie la libération de médiateurs algogènes qui vont activer les fibres afférentes primaires. Les neurones sensoriels primaires, dont les corps cellulaires sont contenus dans les ganglions rachidiens dorsaux (GRD), projettent dans la corne dorsale de la moelle épinière. A ce niveau, le message nociceptif peut être modulé par les interneurons (principalement inhibiteurs) et par les systèmes descendants provenant de structures supra-spinales. Le message nociceptif est ensuite transmis par les neurones post-synaptiques, via plusieurs structures relais, aux régions supra-spinales impliquées dans l'identification et l'intégration de la douleur.

5-HT : sérotonine, CCK : cholécystokinine, CGRP : *Calcitonin gene-related peptide*, GABA : acide gamma amino-butyrique, NGF : *nerve growth factor*, NO : monoxyde d'azote, NPY : neuropeptide Y, PG : prostaglandine.

CHAPITRE 2 : BASES PHYSIOPATHOLOGIQUES DES DOULEURS NEUROPATHIQUES

Après avoir abordé le fonctionnement physiologique des voies de transmission du message nociceptif (de la périphérie jusqu'aux structures cérébrales) et ses mécanismes de contrôle, nous exposerons certains aspects des modifications qui surviennent après lésion de nerf périphérique.

La lésion aboutit souvent à l'exacerbation de l'excitabilité neuronale (sensibilisation) à la fois au niveau périphérique et central.

En dehors de ces phénomènes neuronaux, les cellules immunitaires et gliales contribuent au développement de l'hypersensibilité douloureuse après lésion et ce, à tous les niveaux. Ces cellules vont être « activées » en réponse à la lésion et vont libérer des facteurs algogènes dont font partie les cytokines pro-inflammatoires.

1 Voies de transmission de la douleur : fonctionnement physiologique

L'information douloureuse est perçue à la périphérie par des fibres sensorielles spécialisées et activées uniquement par un stimulus nociceptif. L'influx sensoriel généré par ces nocicepteurs primaires active des neurones (dits secondaires) de la moelle épinière qui projettent via plusieurs structures-relais, dans le cortex, déclenchant la perception douloureuse (Figure 1).

1.1 Mécanismes périphériques de la nociception

1.1.1 Les nocicepteurs

Il y a près d'un siècle, Sherrington proposait l'existence de nocicepteur, un neurone sensoriel primaire activé par un stimulus capable d'engendrer une lésion tissulaire. Les nocicepteurs ont la particularité d'avoir des seuils et des sensibilités caractéristiques qui les distinguent des autres fibres nerveuses. À l'inverse de ce que l'on observe pour les autres fonctions somesthésiques (sensibilité aux stimuli appliqués sur le corps) où sont utilisés des capteurs cutanés (corpuscules de Meissner, de Ruffini ou de Pacini, disques de Merkel...), la détection des stimuli nociceptifs est effectuée au niveau de terminaisons nerveuses libres amyéliniques constituant des arborisations plexiformes dans les tissus cutanés, musculaires et articulaires. Les messages sont véhiculés par les nocicepteurs (fibres nerveuses périphériques A δ et C rassemblées au sein de nerfs) vers la moelle épinière. De façon simplifiée, ces fibres, dont le corps cellulaire se trouve dans les ganglions rachidiens dorsaux (GRD), sont classées selon leur diamètre et la présence ou non d'une gaine de myéline. Les fibres A β sont responsables des sensations tactiles ou proprioceptives, tandis que les fibres A δ et C transmettent les sensations douloureuses et thermiques (Tableau 1).

Fibres afférentes primaires	Diamètre	Gaine de myéline	Vitesse de conduction	Détection
Fibres A α	Gros	Myélinisées	80-120 m.s ⁻¹	Proprioception
Fibres A β	Gros	Myélinisées	35-75 m.s ⁻¹	Toucher fin
Fibres A δ	Moyen	Faiblement myélinisées	6-25 m.s ⁻¹	Nociception (mécanique, thermique, chimique)
Fibres C	Petit	Non myélinisées	0.5- 2 m.s ⁻¹	Nociception (mécanique, thermique, chimique) Température non douloureuse, démangeaison

Tableau 1 : Les différents nocicepteurs

Les nerfs périphériques se composent de fibres afférentes myélinisées de gros (A α et A β) ou de moyen diamètre (A δ) et de fibres amyéliniques de petit diamètre (C).

Les terminaisons nerveuses libres des fibres A δ et C contiennent des protéines-capturs spécifiques (distinctes des autres protéines composant l'axone). Sous l'action d'un stimulus, ces protéines-capturs vont générer un potentiel de récepteur qui, s'il est d'intensité suffisante, aboutira à la naissance d'un potentiel d'action au niveau du segment initial de l'axone. Différents types de protéines associées aux terminaisons nerveuses libres ont pu être caractérisées suivant la nature du stimulus activateur. Il existe des mécano-nocicepteurs sensibles à la pression ou à la déformation du tissu qui sont essentiellement des protéines canaux ioniques. Les plus connus, à l'heure actuelle, sont les thermo-nocicepteurs au chaud avec notamment le récepteur TRPV1 sensible à la capsaïcine et à l'hydrogène. En ce qui concerne la détection du froid nociceptif, aucun récepteur n'a été caractérisé pour l'instant, même si le récepteur au menthol TRPM8, activé pour une température inférieure à 22°C, semble impliqué dans l'allodynie au froid (Xing et al., 2007). Enfin, les terminaisons nerveuses libres des fibres A δ et C sont également sensibles aux stimuli chimiques grâce aux chemo-nocicepteurs qu'elles contiennent. Lors d'une lésion tissulaire, des médiateurs chimiques (bradykinine, sérotonine, ions potassium, histamine, hydrogène, ATP) libérés au site de lésion vont activer leurs chemo-nocicepteurs spécifiques et modifier l'excitabilité neuronale directement ou au travers de seconds messagers (Tableau 2) (Julius and Basbaum, 2001).

1.1.2 Les médiateurs périphériques

Lors d'une lésion tissulaire, des substances algogènes sont produites et libérées par les cellules non-neuronales (fibroblastes) ou plasmiques (neutrophiles, plaquettes) au site de la lésion. La bradykinine, la sérotonine, les ions potassium et l'hydrogène peuvent exercer directement des effets algogènes en activant les nocicepteurs. La substance P joue également un rôle dans la nociception à la périphérie en participant à l'inflammation neurogène. En effet, la stimulation d'un nerf périphérique provoque la libération de substance P par les fibres amyéliniques. La substance P est responsable d'une vasodilatation et d'une augmentation de la perméabilité vasculaire ainsi que de la dégranulation des mastocytes. L'histamine, ainsi libérée, va activer et sensibiliser les nocicepteurs. Le *Calcitonin Gene-Related Peptide* (CGRP) et la neurokinine A ont des propriétés analogues. Les prostaglandines et les leucotriènes, produits à partir de l'acide arachidonique membranaire sous l'action des cyclo-

Type de capteur	Type de stimulus	Protéine-capteur
Mécano-nocicepteur	Pression, déformation	MDEG
	Toucher fin	DRASIC
Thermo-nocicepteur	40°C < T° < 50°C	TRPV1 = récepteur vanilloïde
	T° > 50°C	TRPV2
	T° < 22°C	TRPM8 = récepteur au menthol
Chemo-nocicepteur	Bradykinine	BK ₂
	NGF	TrkA
	Sérotonine	5-HT ₃
	ATP	P2X ₃
	H ⁺	DRASIC, ASIC3, TRPV1

Tableau 2 : Exemples de capteurs présents dans les terminaisons nerveuses libres des fibres afférentes primaires A δ et C.

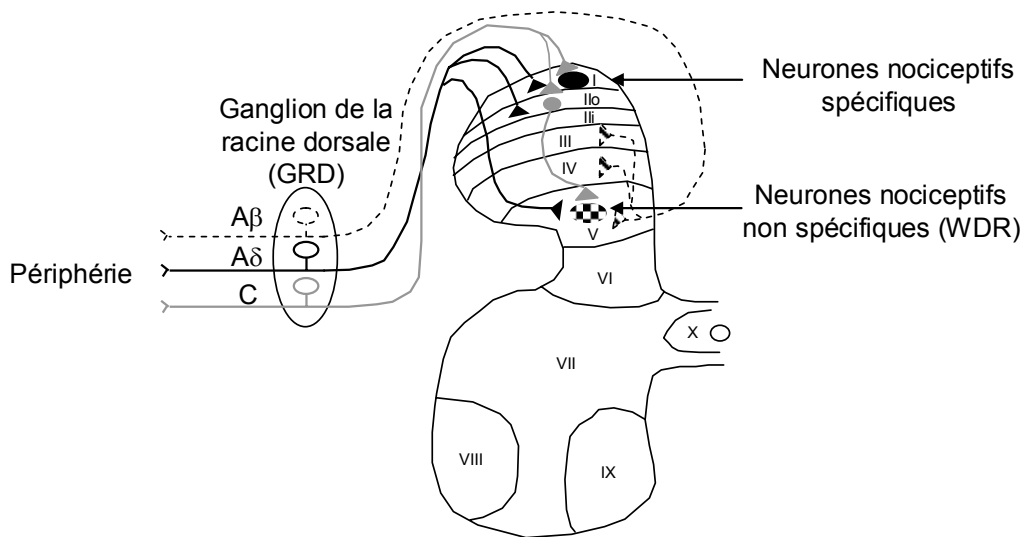


Figure 2 : Principaux sites de projection des fibres afférentes primaires sur la corne dorsale de la moelle épinière.

Les couches sont identifiées par un numéro selon la classification de Rexed (1952). D'après D'Mello et Dickenson, 2008.

oxygénases (COX), participent à la nociception notamment en sensibilisant des récepteurs à l'action d'autres substances (Zeilhofer, 2007).

Le *Nerve Growth Factor* (NGF) est également libéré lors d'une lésion tissulaire par les mastocytes, les fibroblastes ou d'autres types cellulaires. Il induit la dégranulation des mastocytes et augmente la libération périphérique et centrale de substance P et de CGRP, contribuant ainsi à la sensibilisation des nocicepteurs (Guirimand and Le Bars, 1996).

L'ATP, réserve énergétique des cellules, peut être aussi libérée par des cellules non-neuronales lors d'une déformation mécanique par exemple ou la stimulation par différents agents. L'ATP exerce ses effets sur les terminaisons des fibres sensorielles primaires via les récepteurs P2X₃ (Burnstock, 2008).

1.2 Mécanismes spinaux de la nociception

Les fibres afférentes primaires (FAP) acheminent le message nociceptif dans la moelle épinière. La structure de la moelle épinière est caractérisée par les zones appelées substance blanche, contenant en particulier les axones ascendants et descendants myélinisés, et substance grise, constituée en majorité des corps cellulaires de neurones et de cellules gliales. Selon la classification de Rexed, on distingue 10 couches dans la substance grise, 6 dans la corne dorsale, 3 dans la partie ventrale et une couche (X) autour du canal de l'épendyme (Figure 2).

1.2.1 Projections des fibres afférentes primaires

Les axones des fibres nociceptives A δ et C se terminent dans la corne dorsale de la moelle épinière au niveau des couches superficielles (I et II) et de couches plus profondes (V, VI, VII et X) (Figure 2) où ils forment des synapses avec les neurones spinaux (D'Mello and Dickenson, 2008).

1.2.2 La première synapse

Les neurotransmetteurs libérés au niveau de cette première synapse ont fait l'objet de nombreuses recherches et on peut affirmer que le rôle de transmission n'est pas imputable à un seul d'entre eux, même pour une catégorie particulière de fibres. Pas moins d'une vingtaine de substances sont potentiellement libérés à ce niveau parmi lesquelles on distingue les acides aminés excitateurs (glutamate, aspartate), des peptides ou encore, l'ATP (Figure 3). Le glutamate joue un rôle primordial dans la transmission spinale des messages nociceptifs.

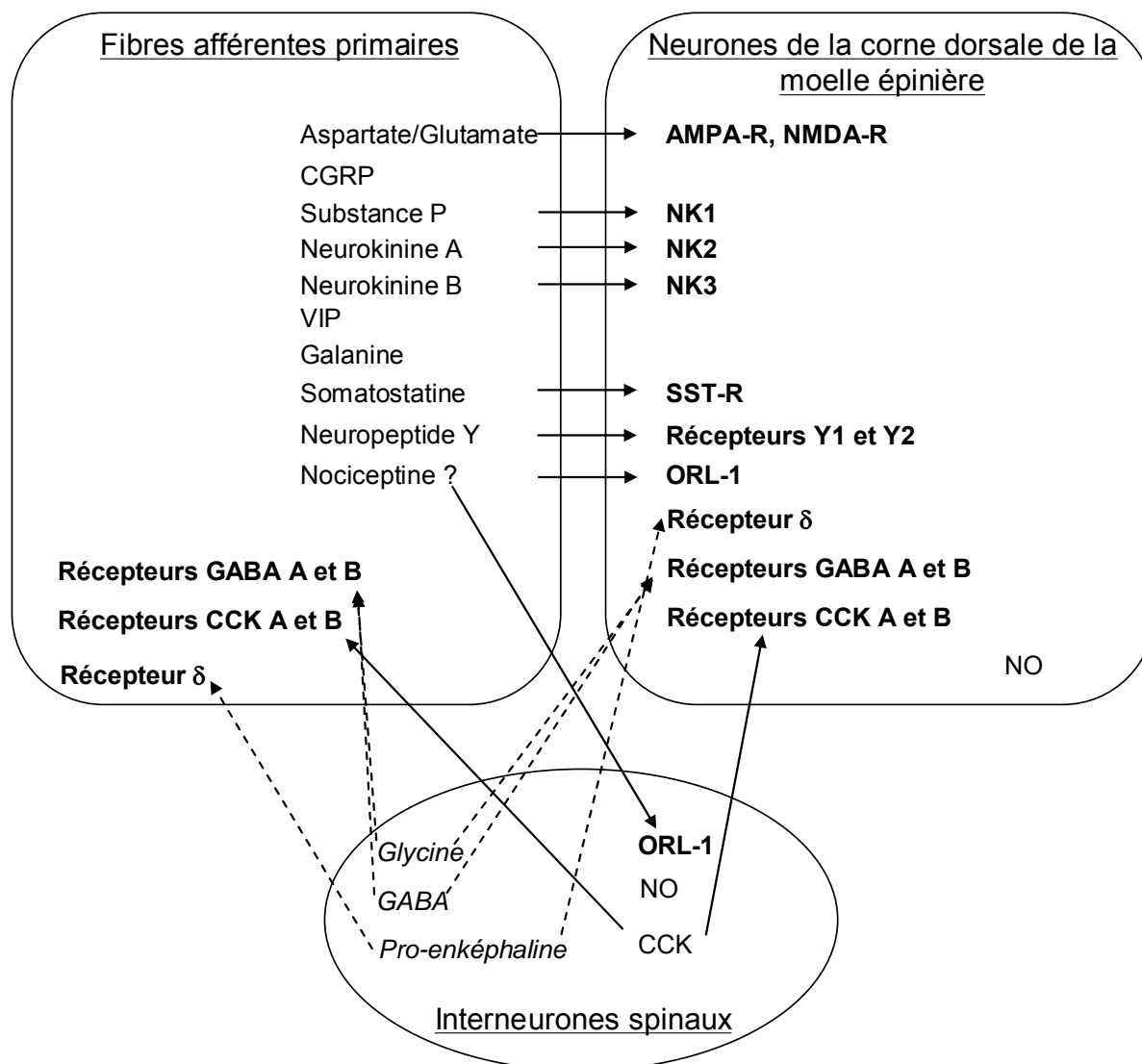


Figure 3 : Les principaux neurotransmetteurs de la première synapse.

En gras, les récepteurs présents en post-synaptique. *En italique*, les neurotransmetteurs exerçant une fonction anti-nociceptive.

AMPA-R : récepteur AMPA (acide aminométhylphosphonique), CCK : cholécystokinine, CGRP : *calcitonin gene-related peptide*, GABA : acide gamma amino-butyrique, NMDA-R : récepteur NMDA (N-méthyl D-aspartate), NK : récepteur à la neurokinine, NO : monoxyde d'azote, ORL-1 : *Opiate receptor-like 1*, SST-R : récepteur à la somatostatine.

Différents récepteurs au glutamate sont présents en post-synaptique : les récepteurs ionotropiques AMPA et NMDA, et les récepteurs métabotropiques.

De nombreux peptides sont également présents dans les FAP et dans les couches superficielles de la moelle épinière. La substance P, d'abord décrite comme un neuromédiateur excitateur, est également un neuromodulateur qui exerce un effet activateur notamment sur la transmission synaptique dépendante des récepteurs NMDA (Urban et al., 1994). Elle est présente dans les terminaisons des FAP au niveau des couches superficielles de la moelle épinière (I et II) mais également dans les interneurons spinaux et les terminaisons des neurones descendants issus du bulbe. Elle agit sur les neurones post-synaptiques préférentiellement au travers des récepteurs de type NK1. Le CGRP, dont la libération est augmentée en réponse à un stimulus nociceptif, est présent quasi-exclusivement au niveau des FAP et a un rôle excitateur et potentialisateur des effets excitateurs de la substance P. D'autres peptides sont également présents dans les FAP et libérés lors d'une stimulation nociceptive. Il s'agit de la somatostatine, du neuropeptide Y, de la neurokinine A, le vasointestinal peptide (VIP), ... (Figure 3). De nombreuses autres molécules agissent à l'étage spinal et influencent la transmission du message nociceptif. Parmi les principaux, citons le GABA, l'acétylcholine, l'adénosine et la sérotonine.

L'ATP est également utilisé comme un neurotransmetteur dans le système nerveux central. Au travers des récepteurs P2X₃ et P2X_{2/3} présents sur les terminaisons centrales projetant dans la couche II de la corne dorsale de la moelle épinière, il exerce un rôle excitateur sur les neurones (Burnstock, 2008).

1.2.3 Les différents types de neurones post-synaptiques ou spinaux

En fonction de leurs propriétés électrophysiologiques, trois catégories de neurones post-synaptiques ont pu être identifiées : les neurones nociceptifs spécifiques, les neurones nociceptifs non spécifiques (neurones convergents, *Wide Dynamic Range*, *Trigger cells*) et les neurones non nociceptifs spécifiques (Tableau 3). Les neurones nociceptifs spécifiques répondent exclusivement à des stimulations nociceptives intenses. Contrairement à ces derniers, les neurones nociceptifs non spécifiques répondent à des stimulations nociceptives et non nociceptives en codant l'information. Des messages provenant des domaines cutanés, viscéraux et musculaires convergent sur un même neurone. Ce phénomène serait à l'origine des douleurs projetées, douleurs ressenties dans un territoire situé à distance du stimulus nociceptif. Ces neurones, capables de réaliser une somation temporelle des messages reçus,

Classe de neurones post-synaptiques	Localisation	Réponse à	Afférences reçues	Champ récepteur périphérique	Codage de l'information douloureuse
Nociceptifs spécifiques	Couches I et II surtout Couches plus profondes (V, VI, VII et X)	Stimulations nociceptives intenses	Fibres A δ et C	restreint	Non, Réponse « tout ou rien »
Nociceptifs non spécifiques = Neurones convergents = <i>Wide Dynamic Range</i> (large gamme dynamique)	Couche V surtout et couches I et II	Stimulations nociceptives et <u>non</u> nociceptives Convergence de l'information provenant des différents domaines cutanés, viscéraux et musculaires	Fibres A α et A β Fibres A δ et C	Large, organisé avec un centre et une périphérie	Oui, Gradient de réponse décroissant (centre -> périphérie)
Non nociceptifs spécifiques	Couches III et IV	Stimulations faibles	Fibres A α et A β		N'interviennent pas dans l'intégration de l'information nociceptive

Tableau 3 : Caractéristiques des neurones post-synaptiques ou spinaux.

sont « sensibilisables » : leur stimulation de manière répétée entraîne une augmentation progressive de leur intensité de décharge (wind-up, voir 2.1.2.2.). Enfin, les neurones non nociceptifs spécifiques répondent à de faibles stimulations et ne sont pas impliqués dans l'intégration de l'information douloureuse (Calvino and Grilo, 2006).

À ce niveau, la transmission peut être modulée par les interneurons présents dans la corne dorsale. Ces interneurons sont majoritairement inhibiteurs (GABA, enképhaline) et reçoivent des afférences provenant des structures supra-spinales.

Les axones de ces trois types de neurones constituent les faisceaux médullaires ascendants qui projettent leurs informations à différents niveaux supraspinaux. La majorité de ces axones vont traverser le plan de symétrie vers le cadran ventral de la moelle épinière (décussation segmentaire basse). Du fait de cette organisation, les sites de projections supraspinaux sont eux aussi contralatéraux.

1.2.4 Structures supra-spinales impliquées dans la nociception

Les neurones nociceptifs de la corne postérieure projettent essentiellement vers 4 sites principaux : le thalamus ventro-postéro-latéral, le bulbe et le mésencéphale, l'hypothalamus et l'amygdale (Figure 4).

Le site principal est constitué par les noyaux situés dans le thalamus ventro-postéro-latéral, noyaux spécifiques de la somesthésie et de la nociception. Ces neurones ont une organisation somatotopique et sont associés à la composante sensori-discriminative de la douleur (lieu et intensité du stimulus).

Il existe des sites de projection dans le bulbe (noyau gigantocellulaire) et dans le mésencéphale (substance grise péri-aqueducale, noyau cunéiforme) qui constituent un relai vers le thalamus médian non spécifique. Cette division médiane est impliquée dans la composante émotionnelle de la douleur ainsi que dans les mécanismes d'alerte (éveil, motricité, augmentation des rythmes cardiaques et respiratoires) associés aux réactions comportementales face à un stimulus douloureux.

L'hypothalamus reçoit des afférences directes et indirectes et intervient dans la réponse végétative à la douleur et la libération d'hormones impliquées dans le contrôle du stress.

Enfin, le complexe amygdalien participe aux réactions affectives et émotionnelles à la douleur.

Les neurones des différents sites décrits précédemment projettent dans des structures corticales distinctes suivant leur provenance. Les neurones du thalamus ventro-postéro-latéral

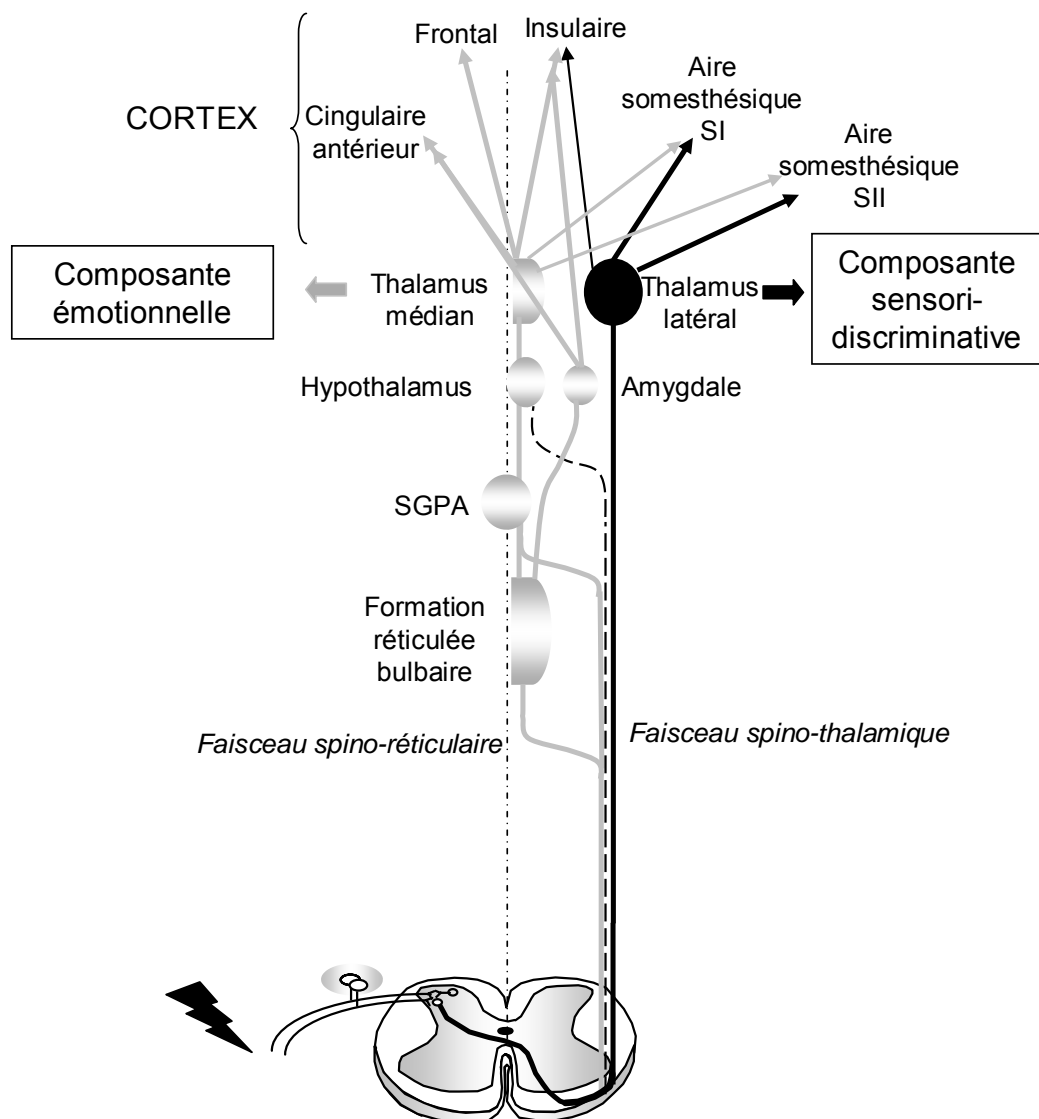


Figure 4 : Les principales voies ascendantes impliquées dans la transmission du signal douloureux.

Il existe 4 sites principaux de projections des neurones nociceptifs spécifiques et non spécifiques au niveau supraspinal. Le faisceau spino-thalamique achemine les informations provenant majoritairement des couches I, IV et V de la moelle épinière et assure, grâce à son organisation somatotopique, la discrimination sensorielle de l'information nociceptive.

Le faisceau spino-réticulaire, projette, via des relais dans le bulbe, la substance grise péri-aqueducule (SGPA) et l'hypothalamus, vers le thalamus médian non-spécifique qui contribue aux réactions cardiorespiratoires, motrices et émotionnelles à la douleur.

En plus de ces 2 faisceaux principaux, le message douloureux emprunte 5 autres voies : les voies spino-ponto-amygdaliennes, spino-ponto-hypothalamiques, spino-hypothalamiques, cervico-latérales et les colonnes dorsales.

projetent dans les aires somesthésiques S1 et S2 du cortex pariétal où le message nociceptif est décodé et où est élaborée la perception de la douleur (lieu, intensité, durée, qualité). Les neurones du thalamus médian projettent leurs axones dans le cortex frontal, insulaire et cingulaire antérieur qui génèrent une réponse émotionnelle plus élaborée à la douleur (Calvino and Grilo, 2006).

1.3 Mécanismes de contrôle de la nociception

Dans tous les systèmes sensoriels, il existe des mécanismes modulateurs qui modifient le seuil et le gain des sensations, jouant un rôle de filtre ou d'amplificateur. La douleur n'échappe pas à cette règle et peut être modulée par l'environnement de l'individu (affectif, socio-culturel, religieux, ethnologique ...) ainsi que par son état psychologique. Ce contrôle met en jeu des mécanismes provenant aussi bien de structures spinales que supra-spinales.

1.3.1 Les contrôles segmentaires spinaux

Le premier type de contrôle se situe au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière sur les neurones nociceptifs non spécifiques (*Trigger cells*, cellules T). Melzack et Wall (1965) ont modélisé cette modulation dans leur théorie de la porte (*gate control theory*) où un neurone nociceptif non spécifique reçoit des influences activatrices provenant des fibres A δ et C et des influences inhibitrices provenant des fibres A α et A β et des neurones supra-spinaux (Figure 5). La cellule T n'est activée qu'en cas de rupture d'équilibre en faveur des afférences excitatrices soit par augmentation d'activité des fibres nociceptives soit par déficit des contrôles inhibiteurs (réalisés en particulier par les interneurones spinaux) (Melzack and Wall, 1965).

L'utilisation en thérapeutique des stimulations électriques appliquées aux nerfs périphériques (*Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation*, TENS) découle de l'application de cette théorie. Ces contrôles segmentaires spinaux sont en plus modulés par des contrôles descendants supraspinaux.

1.3.2 Les contrôles supra-spinaux inhibiteurs descendants

Ils proviennent principalement de deux structures : la substance grise péri-aqueducule et la région bulbaire rostro-ventrale (noyau raphé magnus). Elles exercent via la sérotonine un contrôle inhibiteur sur les neurones nociceptifs non spécifiques (Figure 6). Les axones des

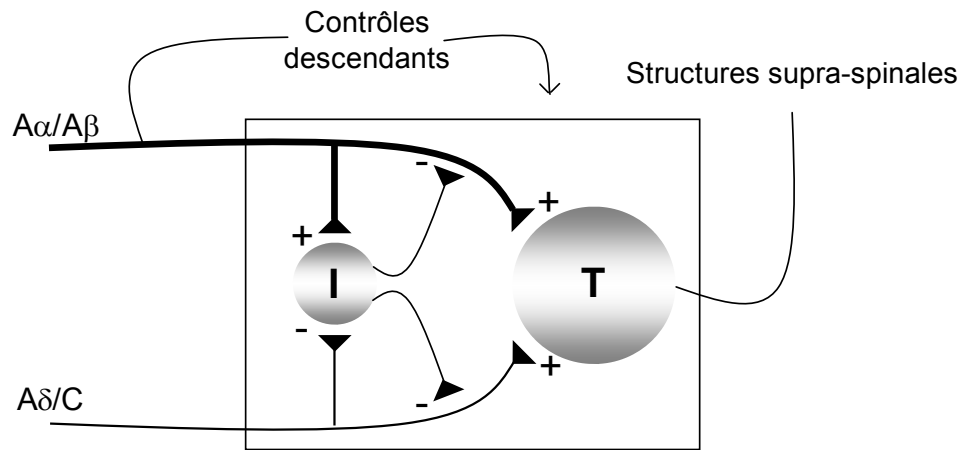


Figure 5 : Schéma de la théorie de la porte (*gate control theory*) tel que proposé par Melzack et Wall en 1965.

L'activité des fibres de gros diamètre ($A\alpha$ et $A\beta$) module celle des fibres de petit diamètre ($A\delta$ et C) en augmentant l'activité des interneurones inhibiteurs (I) qui ferment la porte et empêche la transmission de l'information nociceptive aux structures supra-spinales. L'activation des fibres $A\delta$ et C inhibe l'activité des interneurones inhibiteurs et favorise la transmission du message douloureux.

Wall lui-même en 1978 choisit de modifier sa théorie en faisant intervenir non pas une mais deux classes d'interneurones inhibiteurs : l'une inhibitrice des neurones T activée par les fibres $A\alpha$ et $A\beta$, l'autre excitatrice et activée par les fibres $A\delta$ et C (non illustrées ici).

Ce système de contrôle segmentaire est lui-même soumis aux contrôles descendants provenant des structures supra-spinales.

neurones sérotoninergiques projettent sur la corne dorsale de moelle épinière au niveau de chaque segment spinal. Ces structures participent également à la transmission du message nociceptif et font ainsi partie d'une boucle de rétroaction négative appartenant à un système analgésique endogène activé par des stimulations nociceptives (Basbaum and Fields, 1984). Par ailleurs, les neurones noradrénergiques du locus coeruleus viennent compléter ces contrôles inhibiteurs descendants (Figure 6).

1.3.3 Les contrôles supra-spinaux facilitateurs

Au niveau de la région bulbaire rostro-ventrale, il a été mis en évidence l'existence de 3 types de cellules (Fields et al., 1983) : cellules OFF qui inhibent la transmission du message nociceptif (contrôle inhibiteur descendant, voir 1.3.2.), des cellules neutres et des cellules ON qui facilitent cette transmission (contrôle descendant facilitateur) (Figure 6). Une sous-population de cellules ON contient de la sérotonine (Suzuki et al., 2004).

1.3.4 Les contrôles inhibiteurs diffus induits par une stimulation nociceptive (CIDN)

Ces contrôles s'exercent exclusivement sur les neurones nociceptifs non spécifiques quel que soit le segment spinal (principalement via la sérotonine) et proviennent d'un noyau particulier de la formation réticulée bulbaire (subnucleus reticularis dorsalis) (Figure 6). La stimulation nociceptive réalisée sur n'importe quel territoire corporel pourvu qu'il soit différent du champ récepteur du neurone entraîne une inhibition de l'activité de celui-ci. Plus la stimulation nociceptive est intense, plus l'inhibition est forte. Les neurones nociceptifs non spécifiques reçoivent des informations à la fois nociceptives et non nociceptives (somesthésiques). Par conséquent, le rôle physiologique des CIDN pourrait être celui d'un filtre chargé de discriminer le caractère nociceptif du message des signaux somesthésiques de base (Le Bars et al., 1979a, 1979b).

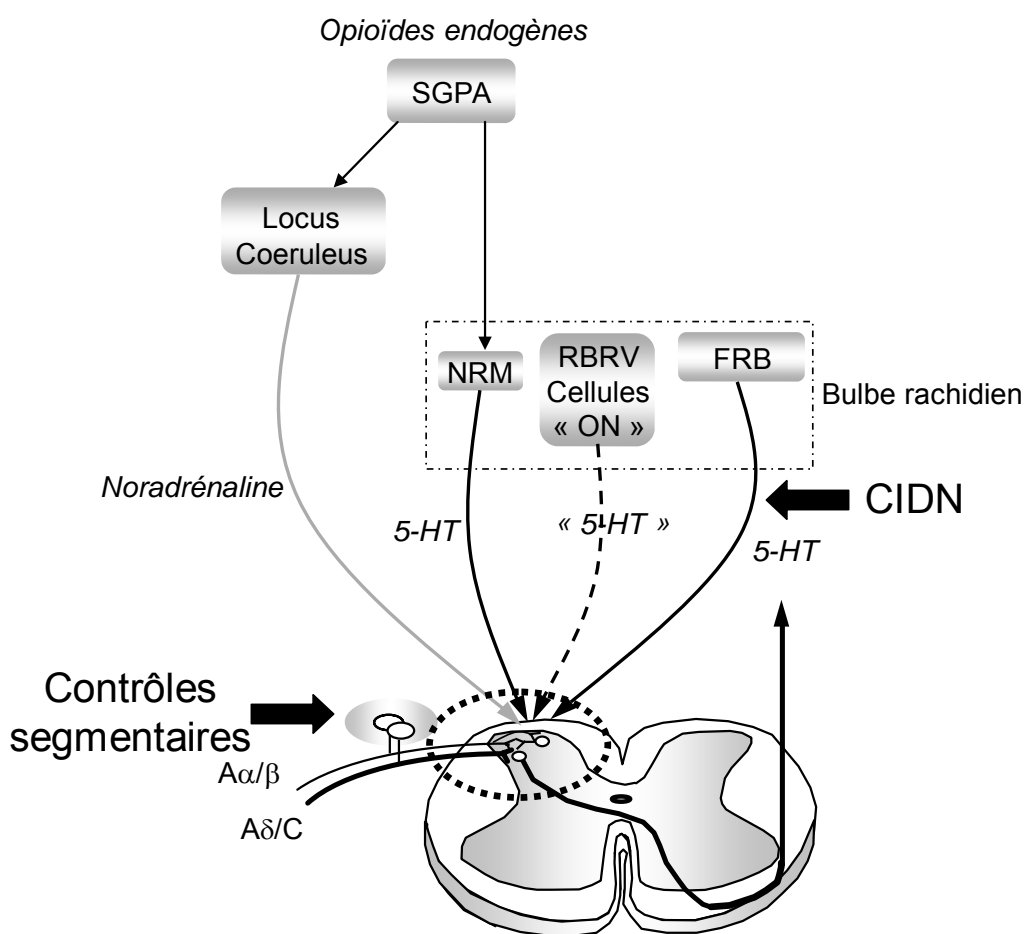


Figure 6 : Représentation schématique des contrôles de la douleur.

On trouve, au niveau spinal, les contrôles segmentaires qui sont sous contrôle des structures supra-spinales. Principalement, la substance grise péri-aqueducale (SGPA), sous influence des opioïdes endogènes, projette sur le locus coeruleus et dans le bulbe rachidien sur le noyau raphé magnus (NRM). Les contrôles inhibiteurs descendants issus de ces structures s'exercent via la noradrénaline et la sérotonine (5-HT). Les CIDN impliquent un noyau particulier de la FRB (subnucleus reticularis dorsalis). La transmission du message nociceptif peut être facilitée par des contrôles facilitateurs (*traits pointillés*) issus des cellules « ON » de la région bulbaire rostro-ventrale (RBRV).

FRB : formation réticulée bulbaire, CIDN : contrôles inhibiteurs diffus induits par une stimulation nociceptive.

2 Transmission du message nociceptif lors des douleurs neuropathiques

Dans des situations pathologiques telles que le développement d'une douleur chronique après lésion de nerf périphérique (douleur neuropathique), la transmission du message nociceptif est altérée. En effet, ce type de lésion entraîne généralement l'apparition d'une hypersensibilité à la douleur. Les termes d'hyperalgésie (sensibilité accrue à un stimulus douloureux) et d'allodynie (douleur évoquée par un stimulus non douloureux) sont souvent associés aux douleurs neuropathiques.

Les mécanismes qui sous-tendent ces deux composantes sont multiples. L'élucidation de ces mécanismes est une étape indispensable pour le développement de traitements qui ciblent réellement la cause plutôt que le symptôme.

Dans ce mémoire seront présentés les principaux changements moléculaires et cellulaires qui se mettent en place après lésion de nerf périphérique (Figure 7).

2.1 Mécanismes neuronaux

Après lésion de nerf périphérique, les voies de transmission du signal douloureux sont modifiées. Les différents neurones impliqués dans cette signalisation subissent des changements notamment de leur excitabilité et de la production de certaines de leurs protéines.

2.1.1 À la périphérie

Les premières altérations surviennent près du site de la lésion. La fragmentation de l'axone et des feuillettes de myéline qui l'entourent (dégénérescence Wallérienne) génèrent des déchets qui sont ensuite phagocytés par les cellules de Schwann et les macrophages, attirés sur le site de la lésion. Les arborisations dendritiques se rétractent et les corps cellulaires des neurones lésés entrent en chromatolyse (dissolution des corps de Nissl). Sous l'effet de facteurs locaux, des cônes de croissance se développent à partir du côté proximal à la lésion. En l'absence d'une structure-guide (tronçon distal), les bourgeonnements (*sprouting*) se font dans les différentes directions où le terrain est propice : il y a alors formation d'un neurome. Si le tronçon distal est préservé, l'élongation des bourgeons est canalisée par la présence des cellules de Schwann restantes. Après reconnexion de l'axone avec ses structures cibles, le nerf formé demeure de plus petit diamètre et contient de petits internodes. Cependant, la réinnervation des cibles n'aboutit pas toujours à restaurer de manière adéquate les fonctions sensorielles et motrices (Navarro et al., 2007).

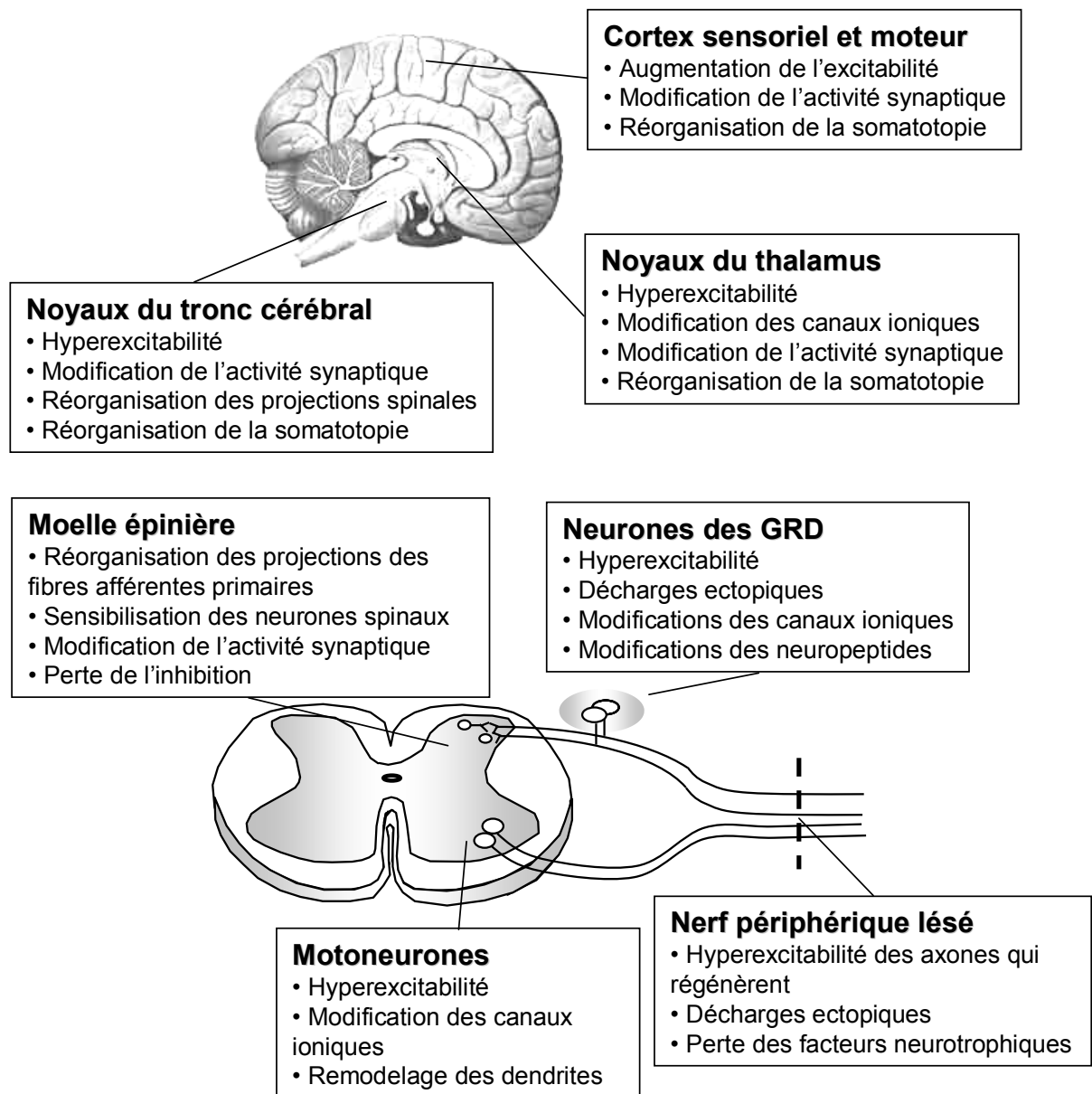


Figure 7 : Représentation schématique des principaux phénomènes qui se développent après lésion de nerf périphérique.

D'après Navarro et al., 2007.

2.1.1.1 Sensibilisation périphérique

En dehors de ces phénomènes axonaux, la lésion tissulaire conduit à la libération de nombreux médiateurs inflammatoires tels que la bradykinine ou les prostaglandines. La bradykinine, au travers de ses récepteurs spécifiques B1 et B2, interagit avec des canaux voltage-dépendant et des récepteurs. Elle exerce ainsi deux effets sur les terminaisons périphériques des fibres afférentes primaires : une excitation directe et la diminution du seuil de réponse, appelés sensibilisation périphérique. Le récepteur TRPV1 à la capsaïcine semble être responsable de la plupart des effets pro-nociceptifs de la bradykinine. En effet, la bradykinine est capable de lever l'inhibition exercée par le phosphatidylinositol biphosphate (PIP₂) sur les récepteurs TRPV1 (Immke and Gavva, 2006) et également de phosphoryler ce récepteur via l'activation de la PKCε. Lorsqu'il est sensibilisé par la bradykinine, TRPV1 est stimulé par des températures inférieures à celles qui l'activent dans des conditions physiologiques (~ 35°C, au lieu de 45°C) (Wang et al., 2006).

Sur le site de la lésion, les macrophages et les cellules de Schwann libèrent également des cytokines et des facteurs trophiques qui participent au phénomène de sensibilisation périphérique (voir 2.2.1.).

2.1.1.2 Activité ectopique

Suite à une lésion, les neurones endommagés peuvent présenter une altération de leur excitabilité, allant jusqu'à la production de potentiels d'action en absence de stimulations périphériques.

L'axotomie provoque l'accumulation au site de la lésion des vésicules de transport contenant notamment des canaux ioniques. À cet endroit, ils vont s'insérer dans la membrane et perturber ainsi les propriétés d'excitabilité locale. La lésion d'un nerf induit également des modifications de transcription (augmentation ou diminution) de différents canaux ioniques (sodiques, potassiques, calciques) et récepteurs dans le GRD. Ces modifications conduisent à des changements phénotypiques du neurone, tels que l'hyperexcitabilité électrique et la résonance. Ce remodelage fonctionnel par accumulation de nouvelles protéines à la membrane semble être un des facteurs responsable de l'activité ectopique ou capacité à générer des potentiels d'action de manière spontanée (Devor, 2006; Navarro et al., 2007).

Ce type de décharges est observé après lésion de nerf périphérique dans les fibres A mais également dans les fibres non lésées de type C et au niveau du GRD. L'augmentation des décharges est corrélée avec le développement de la douleur neuropathique (Liu et al., 2000).

Les décharges ectopiques provenant du système nerveux périphérique (site de la lésion, axone, GRD) contribuent à la douleur neuropathique de deux manières. Elles propagent tout d'abord des impulsions électriques évoquées par un stimulus ou spontanées jusque dans le SNC aboutissant à la genèse d'un signal primaire de douleur neuropathique. D'autre part, l'activité ectopique participe à la sensibilisation centrale et à son maintien en amplifiant notamment les signaux provenant des afférences restantes qui continuent d'innervier le tissu lésé (Gracely et al., 1992).

En plus de ces deux phénomènes principaux, la lésion d'un nerf périphérique induit l'activation de facteurs de transcription capables de moduler l'expression de certains gènes. La modification de la synthèse de nombreuses protéines se traduit par un changement phénotypique du neurone sensoriel primaire, modifiant ses propriétés de transduction, de conduction et de transmission.

2.1.2 Modifications spinales

Suite à la lésion de nerf périphérique, les changements opérés à la périphérie ont des conséquences sur la transmission du message qui parvient dans la corne dorsale de la moelle épinière.

2.1.2.1 Sprouting

Le terme *sprouting* est utilisé pour désigner la formation de nouvelles synapses inadéquates (ephapses). Après lésion, les fibres afférentes primaires vont bourgeonner vers la moelle épinière et former de nouvelles connexions avec les neurones spinaux. Par exemple, les fibres lésées myélinisées (A β) vont établir des contacts avec les neurones nociceptifs spécifiques dans la lamina II qui reçoivent normalement des afférences provenant des fibres C nociceptives. Cette réorganisation peut conduire à l'élaboration de réponses inappropriées aux stimuli tactiles non douloureux (allodynie) (Woolf et al., 1992; Woolf et al., 1995). Toutefois, l'utilisation d'un traceur sélectif a montré l'absence de *sprouting* des fibres A β dans les couches superficielles de la corne dorsale (Hughes et al., 2003). Les fibres C peuvent atteindre des couches plus profondes de la corne dorsale de la moelle épinière contribuant ainsi à une transmission anormale et à des états hyperalgésiques. Les fibres intactes peuvent elles aussi bourgeonner dans des régions normalement occupées par les fibres lésées et peuvent contribuer au développement de douleurs neuropathiques (Hu et al., 2004).

Les mécanismes qui sous-tendent le phénomène de *sprouting* mettent en jeu des facteurs trophiques (NGF, BDNF, GDNF) ainsi que la protéine *Growth Associated Protein 43* (GAP 43) pour les fibres C (pour revue, voir Millan, 1999).

La lésion d'un nerf périphérique est également associée au bourgeonnement des fibres sympathiques dans le nerf lésé et dans le GRD correspondant. L'augmentation de l'activité du système nerveux sympathique qui s'en suit peut contribuer à la mise en place de l'hypersensibilité observée dans les douleurs chroniques. Une étude récente après section complète du nerf sciatique a montré que les fibres sympathiques contactaient préférentiellement les cellules spontanément actives du GRD. L'hyperexcitabilité et l'activité spontanée observées après lésion de nerf dans le GRD augmentent le *sprouting* des fibres sympathiques (Xie et al., 2007).

Cependant, dans certains modèles animaux utilisant la transection des nerfs spinaux S1 et S2, le bourgeonnement des fibres sympathiques post-ganglionnaires ne semble pas jouer de rôle dans le développement des douleurs neuropathiques (Kim et al., 1999). De plus, l'étendue du *sprouting* des fibres sympathiques est proportionnelle au nombre de fibres nerveuses lésées mais n'est pas corrélée avec le degré d'hypersensibilité douloureuse observée lors de douleur neuropathique (Kim et al., 2001).

2.1.2.2 *Wind-up*

La stimulation répétitive et à haute fréquence des fibres C, provoquée par la lésion du nerf, induit une amplification et une prolongation de la réponse des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière aux stimulations afférentes. Ce phénomène est appelé *wind-up* et implique quasi-exclusivement le récepteur NMDA au glutamate. En effet, la libération conjointe de substance P et de CGRP par les fibres C ainsi que de glutamate, provoque une dépolarisation lente du neurone spinal. La dépolarisation soutenue permet alors de lever l'inhibition du récepteur NMDA exercée, en temps normal, par le Mg^{2+} . L'activation du récepteur NMDA induit une entrée massive de Ca^{2+} conduisant à l'activation de différents effecteurs (nNOS, CaMKI/II, ERK) impliqués dans les modifications plastiques à long terme (D'Mello and Dickenson, 2008). La réponse à un influx nociceptif est ainsi amplifiée et prolongée. L'activation des récepteurs NMDA joue un rôle clé dans l'hyperalgésie et l'augmentation de la transmission nociceptive puisque le blocage de ce récepteur réduit les manifestations douloureuses observées chez les patients douloureux chroniques (Sindrup and Jensen, 1999).

Le *wind-up* est un phénomène de courte durée (10s) et représente une forme de sensibilisation à court terme. Cependant, la corne dorsale de la moelle épinière est le siège d'autres changements plastiques de plus longue durée (heure), appelés sensibilisation centrale et qui se manifestent notamment par une hyperalgésie et par une allodynie.

2.1.2.3 *Sensibilisation centrale*

La sensibilisation centrale est un processus dynamique qui dépend des influx nociceptifs provenant de la périphérie (activité ectopique). Son rôle est d'amplifier et de faciliter la transmission synaptique des terminaisons des nocicepteurs primaires vers les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière.

Deux phases sont classiquement décrites pour la mise en place de la sensibilisation centrale (Woolf, 2004). Une phase aiguë qui est initiée par les influx nociceptifs arrivant dans la moelle épinière (activité-dépendante) et une phase tardive maintenue par des changements moléculaires (transcription-dépendante).

Pour être initiée, la sensibilisation centrale requiert une brève mais intense activité des nocicepteurs, telle que l'activité ectopique des neurones sensoriels observée après lésion de nerf périphérique. La libération de médiateurs (neurotransmetteurs, neuromodulateurs) par les fibres afférentes primaires conduit à l'altération de récepteurs synaptiques (densité, seuil, cinétique, activation) aboutissant à une augmentation de la transmission de la douleur. Les mécanismes responsables de ces modifications sont principalement des phosphorylations des canaux ioniques et de récepteurs, et l'activation de kinases intracellulaires (Scholz and Woolf, 2002). Un des récepteurs impliqué est le récepteur NMDA au glutamate dont la phosphorylation augmente l'adressage à la membrane et ainsi la réceptivité au glutamate. Il en résulte une augmentation de l'excitabilité des cellules exprimant ces récepteurs qui vont pouvoir être activées par des stimuli plus faibles. Ce mécanisme est à la base des réponses nociceptives suscitées par des stimuli non douloureux (allodynie), de l'augmentation de la réponse à un stimulus douloureux (hyperalgésie) et de la propagation de la sensibilité aux zones non lésées (hyperalgésie secondaire).

La phase tardive de la sensibilisation centrale est notamment associée aux changements dans la régulation de nombreux gènes dans les neurones spinaux. Par exemple, l'expression du gène de la cyclo-oxygénase de type 2 (COX-2) est fortement induite plusieurs heures après lésion de nerf périphérique dans les neurones de différents sites du SNC. Il en découle une production accrue de PGE₂ responsable d'actions facilitatrices, tant au niveau pré-synaptique que post-synaptique, conduisant à une augmentation de la sensibilité (Woolf, 2004).

La bradykinine, participant à la nociception dès le niveau périphérique, joue également un rôle dans la sensibilisation centrale en potentialisant la transmission synaptique glutamatergique des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière. En effet, la bradykinine est libérée dans la moelle épinière suite à un influx nociceptif et active, via les récepteurs B2, de nombreuses kinases (ERK, PKA et PKC) qui vont potentialiser la transmission glutamatergique et conduire au développement de l'hypersensibilité douloureuse (Wang et al., 2005; Kohno et al., 2008).

La sensibilisation centrale augmente directement l'excitabilité des neurones et aboutit à l'hypersensibilité à la douleur. Toutefois, la perte de l'inhibition peut également provoquer l'augmentation de l'excitabilité et participer ainsi au développement de cette hypersensibilité.

2.1.2.4 Perte de l'inhibition (Desinhibition)

La lésion d'un nerf périphérique induit une perte considérable de courants inhibiteurs, particulièrement ceux provenant de la stimulation des récepteurs GABA. Une des causes de cette diminution peut être la mort par apoptose des interneurons GABAergiques de la corne dorsale de la moelle épinière après lésion de nerf périphérique (Moore et al., 2002; Scholz et al., 2005).

La perte du tonus GABAergique peut également expliquer cette baisse de l'inhibition. Suite à la lésion d'un nerf périphérique, la diminution de l'expression de KCC2, un transporteur potassium-chlorure, induit un changement dans le gradient anionique transmembranaire conduisant à une excitation des neurones de la lamina I par le GABA (Coull et al., 2003). La microglie spinale activée après lésion serait à la base de ce phénomène via l'activation des récepteurs P2X₄ et la production de BDNF (voir 2.2.2.1. ; Coull et al., 2005; Zeilhofer, 2008). Les cytokines présentes dans la moelle épinière après lésion de nerf périphérique, telles que l'IFN γ , peuvent également modifier l'action du GABA vers les neurones spinaux en le rendant excitateur (Vikman et al., 2007). Enfin, la chimiokine MCP-1, présente elle aussi en quantités importantes après lésion, diminue les courants GABAergiques dans les neurones spinaux (Gosselin et al., 2005).

Sensibilisations périphérique et centrale (spinale) sont les causes majeures d'hypersensibilité à la douleur après lésion de nerf périphérique. Toutefois, le niveau supra-spinal participe lui aussi au développement de ce phénomène.

2.1.3 Modifications supra-spinales

La lésion d'un nerf périphérique conduit à des changements plastiques et à la réorganisation des structures impliquées dans la douleur des niveaux cortical et sous-cortical (Chen et al., 2002). En particulier, les structures impliquées dans les contrôles descendants jouent un rôle important dans l'hypersensibilité à la douleur après lésion de nerf périphérique.

Il a été démontré qu'après ce type de lésion, les contrôles facilitateurs descendants provenant de la région bulbaire rostro-ventrale étaient augmentés. Les cellules ON de cette région vont libérer la sérotonine qui exerce ses effets via différents types de récepteurs présents au niveau de la moelle épinière. Les contrôles facilitateurs descendants sont impliqués dans le maintien de la sensibilisation centrale et par conséquent dans celui de la douleur neuropathique (Porreca et al., 2002). Toutefois, ils ne semblent pas jouer de rôle dans l'initiation de la douleur neuropathique (Burgess et al., 2002; Porreca et al., 2002).

Les contrôles inhibiteurs descendants sont également altérés. En effet, au niveau de la région bulbaire rostro-ventrale, la lésion de nerf périphérique augmente la sécrétion de CCK, qui au travers des récepteurs CCK_B, va inhiber les cellules OFF, impliquées dans les contrôles inhibiteurs descendants (Kovelowski et al., 2000; Heinricher et al., 2001). Par ailleurs, les contrôles inhibiteurs descendants provenant du locus coeruleus et exercés par la NA sont diminués après lésion de nerf périphérique (Rahman et al., 2008).

La perte des contrôles inhibiteurs et le gain des contrôles facilitateurs concourent à l'augmentation de l'excitabilité au niveau spinal et à l'hypersensibilité douloureuse.

Outre les modifications des systèmes neuronaux que nous venons d'aborder, les cellules non-neuronales jouent un rôle tout aussi important dans le développement de l'hypersensibilité douloureuse. Longtemps controversé, il a été récemment admis que les cellules immunitaires et gliales, ainsi que les médiateurs inflammatoires qu'elles libèrent, contribuaient au développement des douleurs neuropathiques.

2.2 Contribution des cellules immunitaires et gliales

Les cellules gliales et immunitaires vont, lors d'une lésion de nerf périphérique, s'activer et produire différents médiateurs inflammatoires et/ou pro-nociceptifs. Dès le site de la lésion et jusque dans la moelle épinière et même les structures cérébrales, ces cellules vont migrer et/ou changer de morphologie et de phénotype en réponse à la blessure des nerfs périphériques.

2.2.1 À la périphérie

Beaucoup de cellules immunitaires sont impliquées dans la douleur neuropathique mais leurs contributions relatives ainsi que le décours temporel de leurs effets n'ont pas encore été complètement élucidés (Figure 8).

Sur le site de la lésion, mastocytes, neutrophiles, macrophages, lymphocytes T et cellules de Schwann interagissent et concourent à la sensibilisation des nocicepteurs (pour revue, voir Marchand et al., 2005; Moalem and Tracey, 2006; Scholz and Woolf, 2007).

Les mastocytes, présents dans le nerf périphérique, dégranulent au site de la lésion. Le contenu des granules est riche en histamine, cytokines et protéases qui vont participer à la sensibilisation des nocicepteurs et attirer d'autres cellules sur le site de la lésion. Ainsi, les mastocytes semblent jouer un rôle important dans l'initiation de la douleur neuropathique (Zuo et al., 2003).

Attirés sur le site de la lésion par les produits libérés à partir des mastocytes, les neutrophiles vont sécréter des cytokines (dont le $TNF\alpha$), des réactifs oxygénés, des chimiokines (MCP-1, MIP-1 α) et des défensines qui sont chimioattractantes pour les macrophages. La déplétion en neutrophiles circulants est capable de prévenir mais pas de traiter la douleur neuropathique (Zuo et al., 2003).

Les macrophages sont impliqués dans la phagocytose des débris cellulaires des axones subissant la dégénérescence Wallérienne et des cellules de Schwann lésées. Leur rôle est essentiel pour la repousse axonale. Cependant, ils contribuent aussi à l'hypersensibilité douloureuse en sécrétant différents médiateurs pro-nociceptifs : PGE_2 , réactifs oxygénés et les cytokines pro-inflammatoires $TNF\alpha$, IL-1 β et IL-6 (Sommer and Kress, 2004). De plus, la plupart des études montre une corrélation temporelle entre l'invasion des macrophages et le développement de l'allodynie ou de l'hyperalgésie (Marchand et al., 2005).

En même temps ou après le recrutement des macrophages, les lymphocytes T s'infiltrent dans les nerfs lésés. Peu d'études sont consacrées à la recherche du rôle des lymphocytes T dans la douleur neuropathique. Pourtant, une équipe a montré que le transfert de lymphocytes T de type 1 (pro-inflammatoires) chez des rats *nude* douloureux neuropathiques était capable d'augmenter leur hypersensibilité douloureuse (Moalem et al., 2004).

Dans le nerf intact, la cellule de Schwann encapsule les axones dans la myéline et fournit un support trophique pour le nerf. Lorsque le nerf est lésé, les cellules de Schwann changent radicalement de phénotype et retrouvent la capacité de proliférer et de migrer, puis sécrètent de nombreux facteurs pour contrôler la dégénérescence Wallérienne et la régénération du nerf.

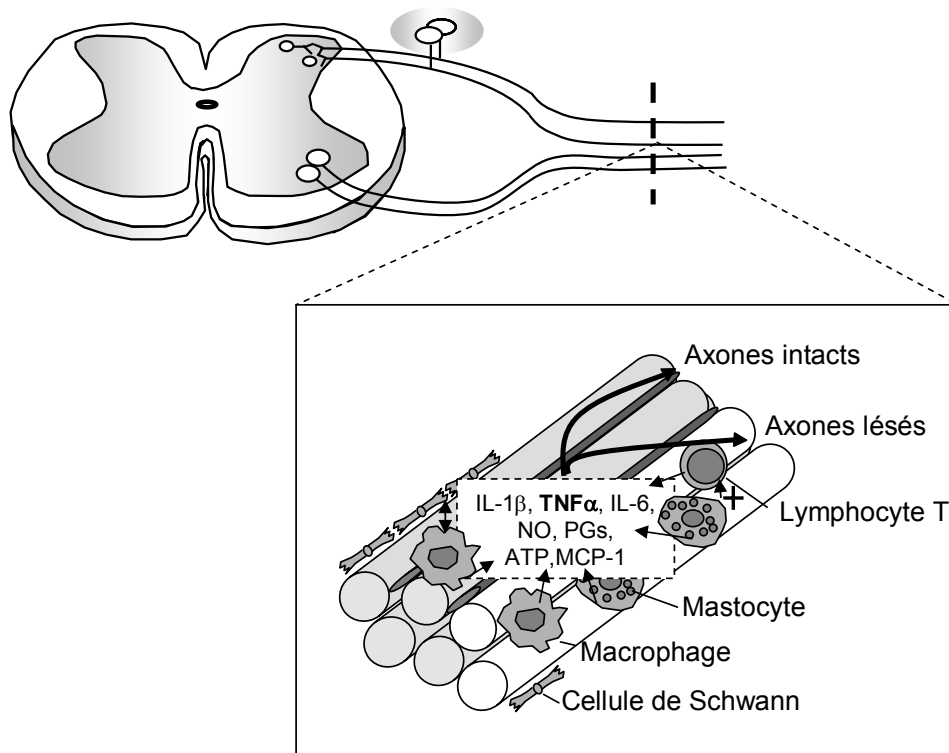


Figure 8 : Intervention des cellules immunitaires et gliales au site de la lésion.

Après lésion de nerf périphérique, certains axones sont lésés alors que d'autres peuvent rester intacts. Néanmoins, la lésion a déclenché le recrutement et la prolifération de cellules non neuronales (cellules de Schwann, mastocytes, macrophages) qui libèrent des facteurs pro-inflammatoires et algogènes ($TNF\alpha$, IL-6, NO, ...). Les macrophages et les mastocytes peuvent, en plus, recruter des lymphocytes T, qui renforcent la réaction inflammatoire.

D'après Marchand et al., 2005.

En quelques heures après la lésion, les cellules de Schwann vont produire des facteurs trophiques (NGF), des cytokines (TNF α , IL-1 β et IL-6), de la PGE₂ et de l'ATP qui vont sensibiliser les nocicepteurs. Cependant, elles sécrètent aussi des facteurs, comme l'Epo ou l'IL-10, capables de contre-balancer les effets pro-inflammatoires des molécules précédemment citées (Campana, 2007). Malgré leur rôle dans la dégénérescence/régénérescence des nerfs, l'implication des cellules de Schwann dans les douleurs neuropathiques n'a pas encore été formellement démontrée.

Les médiateurs produits par l'ensemble de ces cellules autour du site de lésion peuvent influencer directement l'excitabilité des neurones sensoriels grâce à la présence de leurs récepteurs sur les axones (Moalem et al., 2005).

Le recrutement de macrophages et de lymphocytes T a aussi été montré au niveau du GRD après lésion de nerf périphérique (Lu and Richardson, 1993). Toutefois, l'implication de ces cellules immunocompétentes dans les douleurs neuropathiques n'a pas encore été mise en évidence dans cette structure.

Dans le GRD, on trouve aussi, à côté des corps cellulaires des neurones, des cellules ayant des caractéristiques communes avec les astrocytes, appelées cellules gliales satellites. Certaines données récentes suggèrent qu'elles pourraient participer au développement des douleurs chroniques après lésion (pour revue, voir Takeda et al., 2009).

2.2.2 Dans la moelle épinière

La lésion d'un nerf périphérique induit également une extravasation de macrophages et de lymphocytes T dans la moelle épinière (Sweitzer et al., 2002), mais, à ce niveau, leur rôle précis dans la douleur neuropathique n'est, pour l'instant, pas établi.

Cependant, les cellules immunitaires résidentes de la moelle épinière, les cellules gliales, jouent un rôle majeur dans le développement de la douleur après lésion de nerf périphérique.

Les cellules gliales, découvertes par Santiago Ramon y Cajal en 1891, représentent environ 70% des cellules du SNC. Quatre types sont présents dans la moelle épinière : la macroglie constituée par les oligodendrocytes et les astrocytes, la microglie et des précurseurs des oligodendrocytes et des astrocytes.

Longtemps considérées comme de simples cellules de soutien, il est maintenant reconnu qu'elles jouent un rôle majeur dans certaines pathologies dont la douleur chronique. L'activation gliale dans la moelle épinière après lésion de nerf périphérique a été pour la

première fois associée à la douleur en 1991 (Garrison et al., 1991). Il faut toutefois préciser que l'activation de ces cellules est absente dans les douleurs aiguës.

Dans ce mémoire seront uniquement traités la participation de la microglie et des astrocytes dans le développement et le maintien des douleurs neuropathiques.

Néanmoins, le rôle potentiel des oligodendrocytes, cellules myélinisantes du SNC et qui représentent une large proportion des cellules gliales de celui-ci, n'est pas à négliger. En effet, les oligodendrocytes sont en étroite relation avec les neurones, les astrocytes, la microglie et les cellules endothéliales et peuvent ainsi répondre et sécréter différentes molécules. Ces cellules sont également sensibles à l'inflammation et à l'élévation du taux de glutamate, observés, par exemple, lors de la lésion d'un nerf périphérique (McTigue and Tripathi, 2008). Comme suggéré récemment, les oligodendrocytes pourraient constituer les premiers répondeurs aux signaux émis par les neurones lésés et moduler la communication des messages nociceptifs par des signaux inflammatoires (Emery et al., 2006; Ramos et al., 2008; Slaets et al., 2008). Leur rôle dans la douleur demeure, pour l'instant, inconnu.

Bien que dans ce mémoire soit abordé uniquement le rôle de la glie spinale, les cellules gliales, localisées dans les niveaux supra-spinaux, semblent également participer à l'hypersensibilité douloureuse, en contribuant notamment aux contrôles facilitateurs descendants (Wei et al., 2008).

2.2.2.1 Les cellules microgliales

La microglie représente 5 à 12% des cellules du SNC et est distribuée de manière hétérogène. Elle provient de précurseurs monocytiques dérivés de la moelle osseuse ayant migré pendant la période péri-natale. Elle possède de nombreuses caractéristiques communes avec les macrophages. Quelques études ont démontré l'existence de différentes populations de cellules microgliales suivant leur morphologie, leur fonction et l'expression de certains marqueurs (Kuwabara et al., 2003; Wirenfeldt et al., 2005). On distingue également suivant sa localisation la microglie résidente et la microglie périvasculaire. Contrairement à la microglie résidente, la microglie périvasculaire est continuellement reconstituée même à l'état adulte par des précurseurs hématopoïétiques provenant de la moelle osseuse. Le rôle exact de chaque population de microglie dans le SNC sain ou lésé demeure inconnu à l'heure actuelle (Milligan and Watkins, 2009).

Dans des conditions basales, la microglie est appelée « quiescente ». Cependant, elle ne reste pas passive et détecte activement la nature et les changements éventuels de son environnement grâce à ses nombreux prolongements ramifiés (Nimmerjahn et al., 2005). Elle

est impliquée dans la surveillance du SNC et le maintien de son homéostasie (Hanisch and Kettenmann, 2007). Dans des conditions pathologiques telles que la lésion d'un nerf périphérique, la microglie subit des changements qui aboutissent à un état « activé ». L'activation microgliale se traduit notamment par une modification morphologique où la microglie est moins ramifiée et prend une forme amiboïde (Figure 9). Parallèlement à ce phénomène, on assiste à la prolifération de ces cellules (Echeverry et al., 2007) et à l'augmentation de la synthèse de différentes protéines, dont certaines sont notamment utilisées comme marqueurs de l'activation microgliale.

Parmi les protéines-marqueurs couramment utilisés pour quantifier l'activation de la microglie, on distingue l'intégrine α M (ITGAM ou cd11b), la protéine liant le calcium Iba1, la molécule liant l'isolectine IB4 et des molécules du CMH II (Blackbeard et al., 2007). Toutefois, ces protéines ne sont pas réellement des marqueurs spécifiques de la microglie puisqu'elles sont aussi présentes sur les macrophages (Guillemin and Brew, 2004).

La microglie activée a tout d'abord un rôle de défense et de protection en participant aux mécanismes de l'immunité. Toutefois, il a été montré que les effets protecteurs ou toxiques de la microglie dépendaient des conditions d'activation. L'activation microgliale n'est pas un phénomène de « tout ou rien » et différents états d'activation peuvent exister où la microglie peut avoir des effets protecteurs ou non. Il est maintenant clairement admis qu'une activation prolongée de la microglie a un rôle délétère (van Rossum and Hanisch, 2004). Les signaux produits par les cellules voisines, le type et la sévérité de la lésion jouent un rôle prépondérant dans la réponse de la microglie (Lai and Todd, 2008).

Comme déjà mentionné, la lésion d'un nerf périphérique conduit à l'activation et à la prolifération de la microglie dans la moelle épinière (Echeverry et al., 2007). La minocycline, un antibiotique de la famille des tétracyclines, a été utilisé comme inhibiteur de l'activation microgliale, dans des modèles de douleurs neuropathiques chez le rat. L'injection intrapéritonéale de minocycline diminue les comportements associés au développement de la douleur neuropathique dans les phases précoces mais pas tardives (Raghavendra et al., 2003; Latrémolière et al., 2008; Padi and Kulkarni, 2008). L'action de la minocycline diminue également l'expression d'ITGAM (Blackbeard et al., 2007). Par ailleurs, l'implantation intrathécale de microglie activée induit une allodynie mécanique chez le rat naïf (Tsuda et al., 2003). Ces quelques exemples montrent bien que, dans le cas des douleurs neuropathiques, la microglie activée exerce un rôle clairement délétère (Suter et al., 2007; Cao and Zhang, 2008).

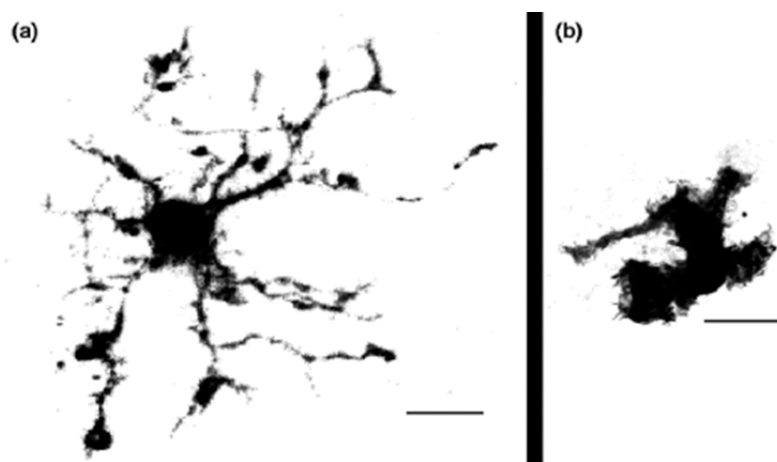


Figure 9 : Cellules microgliales tissulaires injectées avec un colorant (lucifer yellow).

A l'état basal, la microglie a une morphologie ramifiée (a) puis lors de son « activation » prend une forme amiboïde (b). Barres d'échelle = 10 μ m.
Photos extraites de Pocock et Kettenmann, 2007.

Dans la plupart des études, on associe une augmentation de l'expression d'ITGAM avec l'activation de la microglie et le développement de l'hypersensibilité douloureuse. Il arrive néanmoins qu'il n'y ait pas de corrélation entre l'augmentation d'ITGAM et le comportement douloureux (Colburn et al., 1997; Winkelstein and DeLeo, 2002). Afin de mieux corréler l'activation microgliale et l'hypersensibilité douloureuse, certaines équipes utilisent des marqueurs fonctionnels de cette activation, tels que la p38MAPK (Ji and Suter, 2007).

Quoi qu'il en soit, l'activation de la microglie induit généralement la libération de différentes molécules qui peuvent être impliquées dans l'induction de la douleur chronique.

La microglie activée est capable de sensibiliser les neurones en libérant du glutamate ou bien en modifiant les concentrations ioniques via l'activation de canaux sodiques (Nav1.6) ou la dérégulation de canaux potassiques et calciques (De Leo et al., 2006). La microglie possède aussi l'enzyme de synthèse de la D-sérine, un acide aminé qui se fixe sur le site glycinergique du récepteur NMDA et active la transmission glutamatergique (Mothet et al., 2000).

Le BDNF est également produit par la microglie activée par l'ATP au travers des récepteurs P2X₄ (Ulmann et al., 2008). En effet, le BDNF sécrété agit sur les récepteurs TrkB, situés sur les neurones post-synaptiques, et inhibe l'exporteur K⁺/Cl⁻ KCC2 (Coull et al., 2005). Ainsi, on assiste à une modification du gradient anionique et l'incapacité pour les neurotransmetteurs GABA et glycine d'inhiber la dépolarisation de ces neurones (Coull et al., 2003). Le BDNF est par ailleurs capable d'agir sur les neurones excitateurs en augmentant les courants excitateurs (Lu et al., 2009). Il en résulte une augmentation de l'activité de ces neurones spinaux liée à l'apparition de l'hypersensibilité douloureuse (Figure 10).

Certaines données suggèrent que la microglie pourrait elle-même libérer de l'ATP et s'autoactiver de cette manière. En effet, il semble que l'acide phosphatidique, un médiateur phospholipidique dont la production est augmentée dans la corne dorsale de la moelle épinière après lésion, induirait directement la libération d'ATP par la microglie et ainsi, l'ensemble des phénomènes qui en découlent (Fujita et al., 2008; Ueda, 2008).

Parallèlement à la libération des composés que nous venons d'évoquer, certaines voies de signalisation sont activées dans la microglie après lésion et participent au développement de l'hypersensibilité douloureuse.

Par exemple, la cascade du complément est activée dans la microglie dans différents modèles de lésion de nerf périphérique. La protéine effectrice du complément C5a semble jouer un rôle

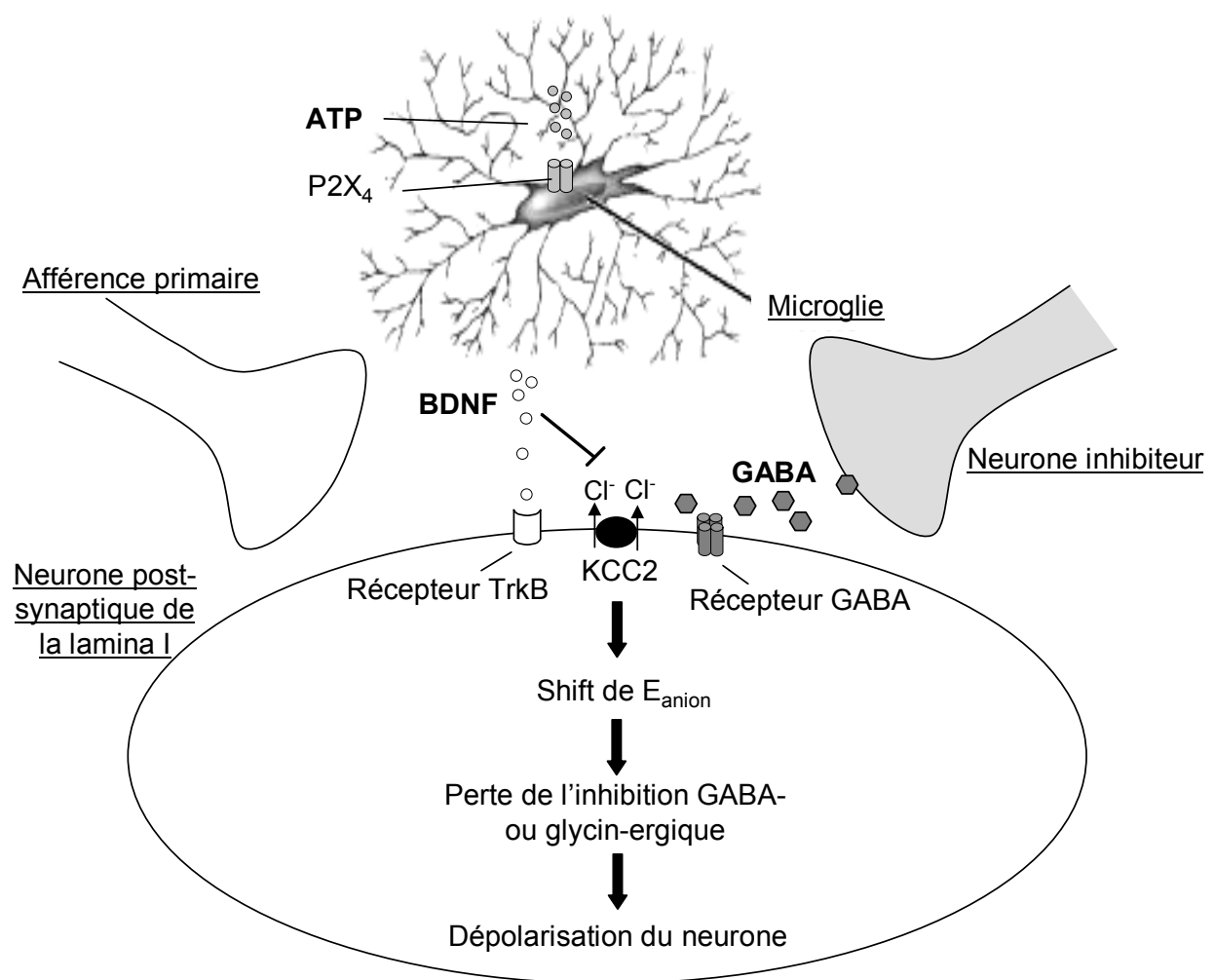


Figure 10 : Conséquences de la libération de BDNF par la microglie activée.

Après lésion de nerf périphérique, la microglie peut être activée, via le récepteur P2X₄, par l'ATP. Il en résulte une libération de BDNF qui va inhiber l'exporteur potassium/chlorure KCC2. On assiste donc à une perte de l'inhibition exercée par le GABA ou la glycine. Il en résulte une dépolarisation du neurone post-synaptique de la lamina I et, par conséquent, l'augmentation de l'hypersensibilité douloureuse (Coull et al., 2003; 2005; Ulmann et al., 2008).

prépondérant dans le développement de la douleur en activant la microglie via le récepteur C5aR (Griffin et al., 2007).

L'activation microgliale est aussi associée à l'activation de MAP kinases (Ji et al., 2008). De nombreuses études effectuées sur différents modèles animaux de douleurs neuropathiques ont montré l'activation par phosphorylation de la p38MAPK et sa contribution au développement et au maintien de la douleur (Jin et al., 2003; Ji and Suter, 2007; Zhuang et al., 2007). Contrairement à la p38 MAPK qui est activée uniquement dans la microglie, une autre MAP kinase, ERK, est activée séquentiellement dans les neurones, la microglie puis les astrocytes après lésion de nerf périphérique (Zhuang et al., 2005).

L'inhibition spécifique de l'activation d'ERK1/2 ou d'ERK5 ont montré que ces deux kinases jouaient un rôle important dans le développement de l'hypersensibilité après lésion de nerf périphérique (Obata et al., 2007). Les activations de la p38MAPK et d'ERK sont observées en même temps dans la microglie après lésion de nerf périphérique. L'inhibition conjointe des deux kinases s'avère plus efficace pour diminuer l'activation microgliale et l'hypersensibilité douloureuse que l'inhibition d'une seule d'entre elles. Cependant, les formes activées de ces kinases, p-p38 et p-ERK, sont exprimées dans des cellules distinctes ce qui pourrait refléter l'existence de populations différentes au sein de la microglie spinale (Suter et al., 2007).

Après lésion de nerf périphérique, la voie de transduction NF- κ B est activée dans les neurones, les astrocytes mais également dans la microglie (Suter et al., 2007). L'inhibition ciblée de cette voie dans les cellules gliales diminue l'hypersensibilité douloureuse observée après ligature lâche du nerf sciatique (Meunier et al., 2007).

L'activation de ces voies de signalisation aboutit à la synthèse, entre autres, de cytokines pro-inflammatoires (voir 2.3.) et de prostaglandines via une augmentation de l'expression de COX-2. L'ensemble des molécules produites par la microglie va agir à la fois sur les neurones mais aussi sur les cellules gliales elles-mêmes (voir 2.2.2.3).

En plus de la microglie, les astrocytes sont également activés après lésion de nerf périphérique.

2.2.2.2 *Les astrocytes*

Les astrocytes, qui proviennent du neuroectoderme, sont les cellules gliales les plus abondantes du SNC. Différentes populations astrocytaires ont été décrites suivant l'expression de certaines protéines (GFAP, S100 β , NG2, voir Tableau 4).

Types d'astrocytes	Marqueurs	Proportion	Morphologie	Recapture du glutamate	Propriétés électriques	Courants	Couplage par jonctions gap
Astrocytes protoplasmiques (substance grise)	GFAP + S100 β -	~50 %	Corps cellulaire irrégulier avec prolongements arborisés	forte	Low input resistance, E_{membrane} très négatif	K ⁺ , voltage et temps indépendants	oui
Astrocytes fibreux (substance blanche)	GFAP - S100 β + NG2 -	?	Prolongements longs, fins et moins ramifiés	faible	Large input resistance, E_{membrane} négatif	Na ⁺ , K ⁺ , voltage dépendants AMPA	non
Cellules transitoires ? (substances blanche et grise)	GFAP - S100 β + NG2 +	?					

Tableau 4 : Les différents types d'astrocytes.

D'après Volterra et Meldolesi, 2005
 GFAP: Glial fibrillary acidic protein

Tandis que la microglie et les oligodendrocytes exercent des fonctions uniques et spécialisées, respectivement la défense du territoire et la myélinisation, la fonction des astrocytes est moins bien définie. Longtemps considérés comme de la simple « glue » assurant la cohésion du tissu nerveux, les astrocytes assurent le maintien d'un environnement viable pour le SNC (recapture du K^+ et des neurotransmetteurs, support trophique pour les neurones, intégrité de la barrière sang-cerveau) mais sont également capables de contribuer au transfert de l'information et à son traitement (pour revue, voir Wang and Bordey, 2008).

Les astrocytes établissent entre eux des « jonctions GAP » perméables à de petites molécules comme les ions, notamment le K^+ et le Ca^{2+} (Kielian, 2008). Il existe de fait une véritable communication entre astrocytes mettant en jeu le Ca^{2+} au travers de « vagues calciques intracellulaires » qui peuvent se propager sur plusieurs dizaines de μm . Cette communication calcique intercellulaire influence la transmission synaptique en modulant la libération astrocytaire de glutamate, d'ATP ou encore de D-sérine (Scemes and Giaume, 2006).

Afin d'apprécier l'activation astrocytaire, différents « marqueurs » sont utilisés : GFAP, vimentine ou S100 β (Figure 11). Bien que les astrocytes ne forment pas une population homogène, la grande majorité des astrocytes de la moelle épinière semble exprimer la GFAP. Lors d'une lésion de nerf périphérique, on assiste à une augmentation de l'immunoréactivité GFAP dans la moelle épinière. Cette modification a été attribuée à une hypertrophie des astrocytes plutôt qu'à leur prolifération ou leur migration (Garrison et al., 1991). Bien que différentes études aient montré une corrélation entre l'expression de GFAP et la douleur chronique observée après lésion de nerf périphérique (Garrison et al., 1991; Colburn et al., 1997; Colburn et al., 1999), l'hypersensibilité à la douleur peut être réduite en absence de diminution de GFAP (Zhuang et al., 2006). Par ailleurs, la protéine liant le calcium, S100 β , voit également son expression augmenter dans la moelle épinière après lésion de nerf périphérique et semble jouer un rôle dans la physiopathologie des douleurs chroniques (Tanga et al., 2006).

L'injection d'une toxine relativement spécifique des astrocytes, le L-alpha-aminoacide, diminue la hausse de l'immunoréactivité GFAP observée après lésion de nerf périphérique et réduit l'allodynie mécanique (Ji et al., 2006; Zhuang et al., 2006). Ainsi, les astrocytes semblent jouer un rôle tout aussi important que celui de la microglie dans les douleurs chroniques.

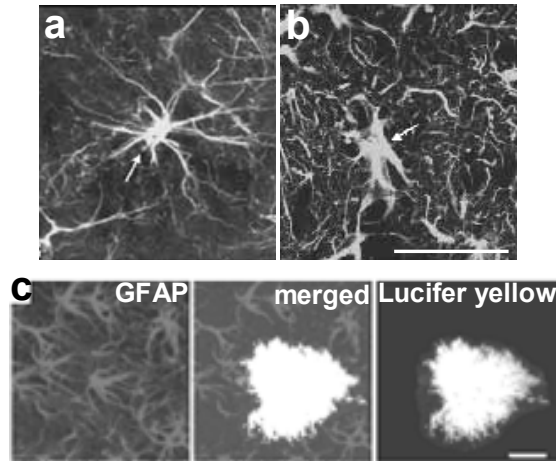


Figure 11 : Visualisation des astrocytes à l'aide de l'immunoréactivité GFAP ou par injection de colorant.

Les astrocytes sont généralement visualisés à l'aide de l'immuno-marquage de la protéine des filaments intermédiaires GFAP. A l'état quiescent, les astrocytes ont de longs et fins prolongements, marqués par GFAP (a). Une fois activés, les prolongements sont moins longs et plus épais (b). Barre d'échelle = 50 μm . Photos extraites de Karwacki et al., 2005. (c) La coloration d'un astrocyte activé avec un colorant (lucifer yellow) montre de nombreux et fins prolongements cellulaires qui ne sont pas visualisables par l'immunoréactivité GFAP (barre d'échelle = 20 μm). Photos extraites de Wilhelmsson et al., 2004.

Après lésion de nerf périphérique, l'activation astrocytaire se traduit par la libération de différentes molécules ayant des actions pro-nociceptives (Tableau 5). C'est le cas par exemple du glutamate dont la concentration extracellulaire est augmentée. En effet, la recapture du glutamate n'est plus assurée à cause de la diminution de l'expression du transporteur GLT-1 par les astrocytes (Sung et al., 2003). De plus, les astrocytes peuvent également moduler leur libération de glutamate (Araque et al., 2000). Tout comme la microglie, les astrocytes libèrent de la D-sérine et activent la transmission glutamatergique. Les astrocytes sont aussi le site principal de régulation du K^+ extracellulaire dans le SNC et sont, par conséquent, des régulateurs critiques de l'excitabilité neuronale. Lors de leur activation, on assiste à une dérégulation des canaux potassiques et à une perturbation de l'homéostasie (De Leo et al., 2006).

La protéine S100 β , exprimée fortement par les astrocytes, peut aussi être libérée dans le milieu extracellulaire. La libération de S100 β est constitutive mais peut être augmentée lorsque les astrocytes sont activés. Suivant la concentration de S100 β présente dans le milieu, elle exerce, via notamment le récepteur RAGE, une action salvatrice (facteur neurotrophique et anti-inflammatoire) ou bien délétère. À forte concentration, elle induit l'apoptose des neurones et l'activation des astrocytes et de la microglie. S100 β peut être ainsi considéré comme un facteur de communication astrocyte-neurone (Bianchi et al., 2008).

L'ensemble des phénomènes que nous venons d'évoquer concoure à l'augmentation de l'excitabilité des neurones et, par conséquent, à l'hypersensibilité douloureuse.

La lésion de nerf périphérique conduit également à l'activation de différentes voies de signalisation dans les astrocytes, telles que les MAPK. La voie ERK est activée dans les astrocytes de manière plus tardive que dans la microglie. En revanche, la voie de la *c-Jun-N-terminal kinase* (JNK) est activée uniquement dans les astrocytes et de façon persistante après lésion de nerf périphérique. Cette voie des MAPK semble elle aussi participer à l'hypersensibilité douloureuse puisque l'utilisation d'inhibiteurs de JNK permet de diminuer totalement l'allodynie mécanique (Zhuang et al., 2006). Le *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF), un facteur d'activation astrocytaire libéré par les neurones et les astrocytes, a été suggéré comme étant le principal activateur de la voie JNK dans les astrocytes (Ji et al., 2006).

Facteurs	Action sur	Voie de signalisation	Facteurs libérés
ATP	Microglie	JNK/ERK/p38	TNF α
	Microglie	p38/PKC	IL-6
	Microglie	ERK/p38/PI3K	radicaux libres
	Microglie	PKC/MAPK	TGF β
ATP	Microglie	?	LIF, plasminogène, IL-1 β
	Astrocytes	NF- κ B	NO
	Astrocytes	PI3K/AKT	?
	Astrocytes	PKC/PKA/ERK	GABA
	Astrocytes	?	glutamate, aspartate
	Astrocytes	ERK/p38	CCL2 (MCP-1)
<u>Cytokines</u>			
TNF α	Microglie	PKC	O $_2^-$
	Microglie	?	TGF β , IL-10
IL-6	Microglie	?	IL-10
IL-1 β	Microglie	?	TNF α
IL-1	Astrocytes	?	NO
Glutamate	Microglie	p38	PGE2
Glutamate	Astrocytes	?	ATP
<u>Peptides</u>			
Substance P	Microglie	p38	?
	Microglie	?	IL-6, PGE2, thromboxane, acides aminés excitateurs
CGRP	Microglie	?	?
Galanine	Astrocytes	?	?

Tableau 5 : Liste non-exhaustive des facteurs pouvant activer la glie et de molécules libérées après son activation.

D'après McMahon et al., 2005.

Comme dans les cellules microgliales, l'activation de ces différentes voies de signalisation aboutit à l'expression de certains gènes dont les produits, citons, par exemple, les cytokines pro-inflammatoires, vont stimuler les neurones et les cellules gliales elles-mêmes.

La lésion d'un nerf périphérique déclenche dans un premier temps l'activation des cellules microgliales et des astrocytes. Toutefois, bien que l'activation gliale en elle-même soit maintenant assez bien caractérisée, il persiste un grand nombre d'interrogations quant à la nature du stimulus activateur (Tableau 5).

2.2.2.3 Les facteurs potentiellement responsables de l'activation gliale

Comme nous venons de le résumer, la microglie et les astrocytes sont activés après lésion de nerf périphérique. Cependant, leur activation n'a pas lieu en même temps. En effet, la plupart des études ont démontré que la microglie était activée plutôt dans les temps précoces après lésion tandis que l'activation des astrocytes était retardée, persistante et corrélait davantage avec le maintien de la douleur. Par conséquent, l'activation microgliale semble être importante pour la genèse de l'hypersensibilité douloureuse alors que les astrocytes participeraient à son maintien (Colburn et al., 1997; Coyle, 1998; Colburn et al., 1999; Raghavendra et al., 2003; Tanga et al., 2004).

Dans les temps précoces après lésion, la microglie reçoit des signaux de différentes natures provenant notamment des neurones lésés et non lésés (Biber et al., 2007).

Les chimiokines, signaux versatiles spécialisés dans le contrôle des interactions cellule-cellule, jouent un rôle dans la communication neurone-microglie après lésion de nerf périphérique. La chimiokine CCL2 (ou MCP-1) est produite par les neurones sensoriels primaires lésés et non lésés et est libérée dans la corne dorsale de la moelle épinière. À ce niveau, elle agit sur son récepteur CCR2 présent sur la microglie et participe à l'activation de cette dernière et au développement de l'hypersensibilité douloureuse (Biber et al., 2008; Thacker et al., 2008). Une autre chimiokine, la fractalkine (ou CX3CL1), est aussi impliquée dans les relations neurone-microglie après lésion de nerf périphérique. À l'état basal, la fractalkine est liée à la membrane du neurone. Après lésion, la fractalkine est clivée (par des protéases de type A désintégrine et métalloprotéases) et libérée. Parallèlement à ce phénomène, son récepteur CX3CR1 est davantage présent sur la membrane de la microglie. La liaison de la fractalkine à son récepteur déclenche l'activation de la voie p38 dans la microglie et contribue à l'allodynie mécanique (Milligan et al., 2005; Zhuang et al., 2007;

Biber et al., 2008; Milligan et al., 2008). Cependant, des travaux récents réalisés chez la souris suggèrent que la fractalkine agirait aussi au niveau périphérique mais, apparemment, avec une action anti-allodynique (Holmes et al., 2008). Il a été montré par ailleurs que la microglie activée synthétise et libère la cathepsine S, une protéase capable de cliver la fractalkine (Clark et al., 2007). Ainsi, la microglie elle-même peut entretenir l'hypersensibilité douloureuse en libérant la cathepsine S et en augmentant la quantité de fractalkine clivée.

D'autre part, les neurones lésés et la microglie peuvent libérer des nucléotides comme l'ATP ou l'UTP. Au travers de récepteurs purinergiques (P2X₄, P2X₇ principalement), l'ATP peut activer la microglie (Inoue, 2002; Inoue et al., 2007; Gong et al., 2008). L'activation du récepteur P2X₄ se traduit notamment par la mise en jeu de la voie p38 qui stimule la synthèse de nouveaux récepteurs P2X₄. Ce mécanisme participerait aux changements plastiques (LTP) observés dans la moelle épinière après lésion de nerf périphérique (Gong et al., 2008).

De nombreuses études ont montré que les *Toll-like Receptors* (TLRs) jouaient également un rôle crucial dans les douleurs neuropathiques. Ils sont exprimés surtout par la microglie (TLR2, TLR3, TLR4) et, dans certaines conditions, par les astrocytes. L'ensemble de ces sous-types participerait à l'hypersensibilité douloureuse après lésion (Tanga et al., 2005; Kim et al., 2007; Bettoni et al., 2008; Obata et al., 2008). Le TLR4 serait impliqué également dans l'activation microgliale (Tanga et al., 2005). La contribution de ce récepteur à l'hypersensibilité douloureuse après lésion se ferait via la protéine accessoire CD14, dont l'expression augmente dans la microglie activée (Cao et al., 2008). Certains de ses ligands ont été identifiés telle que la fibronectine, produite lors d'une lésion tissulaire et qui conduit à l'augmentation de l'expression du récepteur purinergique P2X₄ dans les cellules microgliales, ou bien les *Heat Shock Proteins* (HSP), libérées par les cellules lésées ou mortes. Ce même récepteur est aussi activé par les opioïdes et participerait au développement de la tolérance à ces composés (Milligan and Watkins, 2009).

Par ailleurs, la microglie est capable de répondre aux neurotransmetteurs classiques du SNC, substance P, NO, glutamate, bradykinine, GABA, libérés par les neurones lésés et non lésés (Pocock and Kettenmann, 2007).

Enfin, les cytokines, notamment pro-inflammatoires, peuvent activer la microglie et induire leur propre production et libération (Hanisch, 2002 ; voir paragraphe 2.3)

Dans les phases plus tardives après lésion, l'activation des astrocytes prend le relais de l'activation microgliale. Les astrocytes reçoivent non seulement des signaux provenant des neurones mais également ceux provenant de la microglie activée (Tableau 5).

Les astrocytes sont capables de détecter la présence de neurotransmetteurs comme le glutamate, la noradrénaline, l'histamine, l'acétylcholine ou encore l'ATP (Fellin et al., 2006) grâce aux nombreux récepteurs qu'ils expriment (Porter and McCarthy, 1997).

La microglie synthétise des cytokines qui vont activer les astrocytes (Tableau 5). Récemment, il a été montré que la cytokine IL-18, produite par la microglie activée via stimulation de la voie TLR4/p38MAPK, induisait la phosphorylation de NF- κ B et l'augmentation de la synthèse de GFAP dans les astrocytes (Miyoshi et al., 2008). Toutefois, lors d'expériences réalisées *in vitro*, l'expression de GFAP par les astrocytes est diminuée en présence de milieu conditionné de microglie stimulée par le LPS (Rohl et al., 2007).

À l'heure actuelle, de nombreux signaux intervenant dans l'activation gliale après lésion de nerf périphérique ont été identifiés et nous venons d'en présenter certains éléments. Néanmoins, la cascade de réactions aboutissant à la genèse de la douleur chronique reste largement incomplète.

Afin de traiter les douleurs chroniques neuropathiques, l'inhibition de l'activation gliale semble représenter une possibilité séduisante. En effet, dans différents modèles de lésion de nerf périphérique chez l'animal, l'utilisation d'inhibiteurs gliaux comme le fluorocitrate, la pentoxifylline et la propentofylline permet de prévenir ou diminuer l'hypersensibilité à la douleur après lésion (Milligan et al., 2003; Liu et al., 2007; Tawfik et al., 2007). Cependant, microglie et astrocytes sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie du SNC. Les cellules gliales activées peuvent exercer des actions protectrices vis-à-vis des neurones et des oligodendrocytes (Sofroniew, 2005) qui seront également abolies lors de l'inhibition globale de l'activation gliale (Milligan and Watkins, 2009). Afin de s'affranchir de ce problème, il est nécessaire de découvrir quels signaux provenant de la glie activée sont réellement délétères et d'agir en aval de l'activation gliale.

2.3 Implication des cytokines pro-inflammatoires

Après lésion de nerf périphérique, on assiste à la libération de différentes molécules pro-algésiques par les cellules lésées ou activées. Outre l'histamine, la bradykinine, l'ATP, la sérotonine ou les prostaglandines, les cytokines jouent un rôle aussi bien à la périphérie que dans la moelle épinière en agissant directement ou indirectement sur les neurones sensoriels primaires ou de second ordre (Moalem and Tracey, 2006).

Les cytokines sont de petites molécules (5 à 30 kDa) impliquées dans les interactions cellule-cellule et qui agissent à courte distance de leur lieu de sécrétion. Certaines d'entre elles sont pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β et IL-6), d'autres exercent une activité anti-inflammatoire comme, par exemple, l'IL-10. L'implication des cytokines dans la douleur a été démontrée pour la première fois en 1988 (Ferreira et al., 1988). Mais, comme l'attestent des expériences d'inhibition de leur activité, les cytokines ne participent pas à la douleur aiguë (Ramer et al., 1998; Sweitzer et al., 2001).

Les cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β et IL-6) sont impliquées dans les phénomènes d'hypersensibilité à la douleur. Elles agissent aussi bien à la périphérie qu'au niveau central. Leur rôle à la périphérie a notamment été étudié sur des préparations peau-nerf. Par exemple, l'application de ces cytokines sur ce type de préparation augmente de façon transitoire la libération de CGRP induite par la chaleur. Les mécanismes impliqués sont très rapides et suggèrent une régulation post-transcriptionnelle (Oprea and Kress, 2000). Après lésion de nerf périphérique, l'expression de ces 3 cytokines est également augmentée dans la moelle épinière (Winkelstein et al., 2001). Injectées par voie intrathécale, elles augmentent l'activité des neurones de la corne dorsale et induisent chez l'animal une hypersensibilité douloureuse (Reeve et al., 2000).

Des études cliniques ont d'ailleurs montré qu'il existait un déséquilibre entre cytokines pro- et anti-inflammatoires chez les patients atteints de neuropathie douloureuse. Ce déséquilibre serait un facteur prédisposant pour l'apparition de la douleur chronique dans les cas des neuropathies (Koch et al., 2007; Uceyler et al., 2007; Uceyler and Sommer, 2008).

Même si elles concourent à l'augmentation de l'hypersensibilité douloureuse soit en modifiant le seuil nociceptif des neurones ou bien en activant d'autres cellules comme les cellules gliales, TNF α , IL-1 β et IL-6 exercent des effets distincts (pour revue, voir Sommer and Kress, 2004; Schäfers and Sorkin, 2008). Par conséquent, nous aborderons pour chacune d'entre elles, leurs actions spécifiques dans le nerf lésé, dans le GRD puis dans la moelle épinière.

2.3.1 Le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α)

Le TNF α est considéré comme le prototype de la cytokine pro-inflammatoire à cause de son rôle initiateur dans l'activation des cytokines, notamment IL-1 β et IL-6, et des facteurs de croissance. Après lésion, le TNF α est sécrété par différents types cellulaires présents sur le

site de la lésion, notamment les cellules de Schwann, les neutrophiles, les macrophages, les mastocytes et les cellules endothéliales (Wagner and Myers, 1996; Shamash et al., 2002).

Au niveau périphérique, le TNF α libéré peut sensibiliser directement les neurones sensoriels primaires. En effet, l'injection sous-cutanée ou périneurale de TNF α provoque une diminution des seuils de réponse des nocicepteurs de type C et une activité continue dans les fibres C (Junger and Sorkin, 2000; Zelenka et al., 2005). De la même manière, les thérapies utilisant des anticorps anti-TNF α , injectés dans le nerf, diminue l'allodynie et l'hyperalgésie après lésion de nerf périphérique (Schäfers et al., 2001).

La lésion de nerf périphérique induit une augmentation de l'expression du TNF α dans les neurones de moyen et de gros diamètre du GRD ainsi que du transport du TNF α vers le site de la lésion (Schäfers et al., 2002). Cependant, une autre équipe a montré que le TNF α était surtout produit par les cellules satellites GFAP⁺ du GRD qui entourent les corps cellulaires de neurones exprimant la sous-unité p55 du récepteur au TNF α (Ohtori et al., 2004).

Le blocage du TNF α par injection systémique de son antagoniste, l'étaNERCEPT, est capable de diminuer l'allodynie mécanique après lésion de nerf périphérique, seulement s'il est injecté avant la lésion, ce qui suggère un rôle précoce et transitoire du TNF α dans l'initiation de la douleur. La p38 MAPK semble responsable, du moins en partie, des effets du TNF α puisque le traitement avec l'étaNERCEPT diminue l'activation de cette kinase dans le GRD (Schäfers et al., 2003). L'activation de la p38 par le TNF α conduit à la potentialisation des courants sodiques tétradotoxine-résistants dans les neurones du GRD, responsables en partie de l'allodynie mécanique (Jin and Gereau, 2006).

Le TNF α active aussi la voie ERK dans les neurones du GRD et augmente l'expression des récepteurs TRPV1 impliqués dans l'hyperalgésie thermique (Hensellek et al., 2007).

La sensibilisation des fibres nerveuses périphériques par le TNF α semble être aussi assurée par des cascades de phosphorylations impliquant des sérines/thréonines kinases, notamment la PKA (Liu et al., 2002; Zhang et al., 2002).

Dans la moelle épinière, l'expression de TNF α est également augmentée après lésion de nerf périphérique (DeLeo et al., 1997; Lee et al., 2004). Certains astrocytes activés après lésion peuvent produire et libérer du TNF α qui va agir à proximité sur les neurones spinaux portant le récepteur p55 (Ohtori et al., 2004). Certaines données suggèrent également que le TNF α

présent dans la moelle épinière pourrait provenir des neurones du GRD (Shubayev and Myers, 2002).

Les traitements locaux visant à inhiber la signalisation du TNF α dans la moelle épinière tels que l'injection intrathécale de la forme soluble du récepteur au TNF α ou sa production par un vecteur viral herpétique, diminuent les comportements douloureux après lésion de nerf périphérique (Sweitzer et al., 2001; Hao et al., 2007). L'injection intrathécale d'éta nercept permet d'obtenir les mêmes effets et diminue la phosphorylation de la p38 dans la moelle épinière (Svensson et al., 2005).

Ainsi, le TNF α augmenterait l'excitabilité dans le SNC en agissant notamment sur les transporteurs du glutamate. En effet, le TNF α diminue l'expression de GLT-1 et la recapture du glutamate par les GLAST (Korn et al., 2005; Sitcheran et al., 2005). De plus, il a récemment été montré que le TNF α augmente la fréquence des courants post-synaptiques excitateurs spontanés et des courants NMDA et AMPA (Kawasaki et al., 2008).

2.3.2 L'interleukine 1 β (IL-1 β)

L'IL-1 β est la première cytokine pro-inflammatoire à avoir été découverte comme agent hyperalgésique (Ferreira et al., 1988). Lors de la lésion d'un nerf périphérique, l'IL1 β peut être libérée par les monocytes, les fibroblastes, les cellules de Schwann, les cellules endothéliales et les neurones sensoriels primaires eux-mêmes (Watkins and Maier, 1999; Shamash et al., 2002). L'expression d'IL-1 β est augmentée dans le nerf lésé et l'injection intraneurale d'IL-1 β induit des comportements associés aux douleurs neuropathiques (Okamoto et al., 2001; Zelenka et al., 2005). Au contraire, l'injection d'anticorps anti-IL-1 β diminue ce type de comportements (Sommer et al., 1999; Schäfers et al., 2001).

L'application d'IL-1 β sur une préparation peau-nerf (ne contenant pas les corps cellulaires des neurones), facilite la libération de CGRP de manière très rapide démontrant une action directe (sans synthèse de second messagers) sur les fibres nerveuses (Fukuoka et al., 1994).

Au sein du GRD, les corps cellulaires des neurones sensoriels primaires portent des récepteurs à l'IL-1 β , suggérant une action autocrine ou paracrine sur l'information nociceptive (Coprav et al., 2001). L'IL-1 β peut agir sur les neurones sensoriels et augmenter leur susceptibilité à la chaleur en activant des tyrosines kinases comme la PKC (Sommer and Kress, 2004).

Dans la moelle épinière, l'expression d'IL-1 β est augmentée après lésion de nerf périphérique (DeLeo et al., 1997; Lee et al., 2004). Bien que de nombreuses données suggèrent que l'IL-1 β serait principalement produite par les cellules gliales et surtout la microglie, les inducteurs et les types cellulaires responsables de cette augmentation n'ont pas encore été identifiés (Bartholdi and Schwab, 1997; Lai and Todd, 2006). L'injection intrathécale d'IL-1 β induit chez le rat naïf une hyperalgésie au chaud via une augmentation de l'expression d'iNOS (Sung et al., 2004). Toutefois, l'injection de l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 β (IL-1RA) est incapable de diminuer l'allodynie après lésion de nerf périphérique. En revanche, l'allodynie est prévenue si l'antagoniste est utilisé en combinaison avec le récepteur soluble du TNF α , suggérant un rôle secondaire de l'IL-1 β au niveau spinal (Sweitzer et al., 2001). L'IL-1 β participe néanmoins à l'aggravation de l'excitabilité centrale en augmentant la fréquence et l'amplitude des potentiels post-synaptiques excitateurs et en réduisant ceux des potentiels inhibiteurs. Elle augmente également les courants AMPA et NMDA, comme le TNF α , et supprime les courants induits par le GABA ou la glycine (Kawasaki et al., 2008).

Quelques études ont montré que l'utilisation combinée de systèmes bloquant l'activité du TNF α et d'IL-1 β donnait de meilleurs résultats que s'ils étaient utilisés seuls (Schäfers et al., 2001; Sweitzer et al., 2001). Ces données suggèrent que ces cytokines agissent davantage en synergie qu'en cascade.

2.3.3 L'interleukine 6 (IL-6)

L'IL-6 est considérée majoritairement comme une cytokine pro-inflammatoire. Toutefois, il faut savoir que dans certains cas, cette cytokine peut jouer un rôle clairement anti-inflammatoire (Jordan et al., 1995; Tilg et al., 1997). Au sein du système nerveux, l'IL-6 peut exercer à la fois des effets bénéfiques et délétères (pour revue, voir Gadiant and Otten, 1997) et est impliquée dans la survie et la différenciation neuronale (Kushima and Hatanaka, 1992; Marz et al., 1997; D'Arcangelo et al., 2000; Pizzi et al., 2004).

L'IL-6 exerce ses effets via son récepteur spécifique IL-6R α (gp80) et la sous-unité gp130, commune aux cytokines de la famille de l'IL-6, chargée de transmettre le signal en intracellulaire (Heinrich et al., 2003). La sous-unité gp130 est exprimée de manière ubiquitaire et constitutive mais son expression peut être augmentée par l'IL-6. De fait, c'est l'expression d'IL-6R α qui conditionne la réponse d'une cellule à l'IL-6. La sous-unité IL-

6R α peut être membranaire mais est également présente sous forme soluble (sIL-6R α). La forme soluble du récepteur, générée par protéolyse limitée de la forme membranaire ou par traduction à partir d'un deuxième codon initiateur, semble jouer un rôle clé dans la signalisation de l'IL-6. La forme sIL-6R α , présente notamment dans le sérum humain, a la capacité de lier l'IL-6 et de transduire le signal via la gp130 transmembranaire. Ainsi, même les cellules ne possédant pas d'IL-6R α membranaire peuvent être stimulées par l'IL-6 (Narazaki et al., 1993; Rose-John et al., 2006).

Après lésion de nerf périphérique, l'expression de l'IL-6 est détectée dès 24h au site de la lésion (Murphy et al., 1995). À ce niveau, ce sont surtout les cellules de Schwann (Bolin et al., 1995; Kurek et al., 1996), mais aussi les macrophages (Ma and Quirion, 2005) et les cellules endothéliales vasculaires (Grothe et al., 2000) qui produisent l'IL-6. L'expression des récepteurs de l'IL-6 est augmentée (IL-6R α et gp130), notamment sur les cellules de Schwann elles-mêmes (Ito et al., 1998; Lara-Ramirez et al., 2008).

Dans le GRD, l'IL-6 est aussi exprimée dès 2 jours après lésion dans les neurones de moyen et de gros diamètres (Murphy et al., 1995). L'expression d'IL-6 dans les neurones sensoriels primaires est notamment stimulée par les mastocytes activés au site de la lésion qui déversent le contenu de leurs granules dans le milieu extracellulaire (Murphy et al., 1999). La dépolarisation, observée par exemple lors d'une axotomie, peut également induire l'expression d'IL-6 dans les neurones sensoriels primaires (Sallmann et al., 2000). Comme pour le TNF α , l'IL-6 peut être aussi produite par les cellules satellites GFAP⁺ (Dubovy et al., 2008).

À la périphérie, l'IL-6 semble jouer un rôle pro-nociceptif car elle agit sur les nocicepteurs cutanés en augmentant leur susceptibilité à la chaleur via la gp130 et en activant le récepteur TRPV1 (Obreja et al., 2002; Obreja et al., 2005; Benetti et al., 2008). L'IL-6 peut aussi agir sur les neurones sensoriels et augmenter l'expression de neuropeptides impliqués dans la transmission du message nociceptif comme la galanine (Thompson et al., 1998; Murphy et al., 1999).

Cependant, elle joue également un rôle non négligeable dans la régénération des fibres lésées et dans le développement et le maintien des fonctions des fibres sensorielles (Zhong et al., 1999; Streit et al., 2000; Galiano et al., 2001; Shuto et al., 2001).

La lésion de nerf périphérique induit également une augmentation de l'expression d'IL-6 dans la moelle épinière, qui corrèle avec le développement de l'allodynie mécanique (DeLeo et al., 1996). De plus, l'injection intrathécale d'IL-6 induit ou augmente l'hypersensibilité douloureuse chez des rats naïfs ou douloureux neuropathiques respectivement (DeLeo et al., 1996; Vissers et al., 2005; Kawasaki et al., 2008). À l'inverse, l'immunoneutralisation de l'IL-6 par des anticorps spécifiques injectés par voie intrathécale diminue l'allodynie mécanique chez des rats neuropathiques (Arruda et al., 2000). Les effets de l'IL-6 au niveau spinal se traduisent, entre autres, par une réduction des courants inhibiteurs GABA- et glycinergiques, potentialisée par l'ajout de récepteurs solubles de l'IL-6, et qui aboutissent à une augmentation globale de l'excitabilité (Kawasaki et al., 2008). L'IL-6 pourrait aussi participer au développement des douleurs neuropathiques en augmentant l'expression du récepteur NMDA dans les neurones spinaux, dont le rôle dans la sensibilisation centrale est bien connu (voir 2.1.2.3) (Wang et al., 2004; Wang et al., 2005).

La majorité des études réalisées s'accordent sur le fait que l'IL-6 joue un rôle pro-nociceptif. Toutefois, une équipe a présenté des effets totalement opposés. Ces auteurs ont montré que l'IL-6, administrée au niveau spinal, diminue la réponse des fibres C chez des rats neuropathiques (Flatters et al., 2003). Au niveau périphérique, l'IL-6 réduit les réponses évoquées à la chaleur chez des rats neuropathiques et induit une hypoalgésie thermique chez des rats naïfs (Flatters et al., 2004).

Nous venons de voir que l'IL-6 peut agir directement sur les neurones. Au niveau spinal, les cellules gliales peuvent aussi répondre à l'IL-6. De nombreuses études réalisées chez des souris génétiquement modifiées pour produire de l'IL-6 dans le système nerveux ou, au contraire, présentant une délétion du gène de l'IL-6, ont démontré que cette cytokine contribuait à l'activation gliale (Chiang et al., 1994; Fattori et al., 1995; Klein et al., 1997). Ces données sont étayées par d'autres expériences montrant que l'injection d'anticorps neutralisants le récepteur de l'IL-6 (IL-6R α) après lésion de la moelle épinière diminue l'astrogliose (Okada et al., 2004). Par ailleurs, les effets de la minocycline, utilisée comme inhibiteur de l'activation microgliale, pourraient résulter, du moins en partie, de la diminution de l'expression d'IL-6 (Zanjani et al., 2006; Latrémolière et al., 2008). Bien que l'ensemble de ces données suggèrent la participation de l'IL-6 à l'activation gliale, il est à remarquer que l'injection intrathécale d'anticorps anti-IL-6 ne semble pas avoir de conséquences sur l'expression spinale des marqueurs gliaux après lésion de nerfs périphériques (Arruda et al., 2000).

Après lésion de nerf périphérique, l'IL-6 est libérée dans la moelle épinière. Il a notamment été montré que l'expression des ARNm IL-6 était augmentée surtout dans les neurones de la moelle épinière (Arruda et al., 1998). Cependant, microglie et astrocytes sont aussi capables de produire de l'IL-6 (Gadient and Otten, 1997; Van Wagoner and Benveniste, 1999; Milligan et al., 2000; Ledebor et al., 2005). Dans les astrocytes notamment, il a été montré que l'IL-6 était capable d'induire sa propre production (Van Wagoner et al., 1999).

Tout comme les cytokines pro-inflammatoires TNF α et IL-1 β , l'IL-6 joue un rôle plutôt pronociceptif tant à la périphérie qu'au niveau central (pour revue, voir De Jongh et al., 2003) et semble être impliquée dans l'activation gliale.

L'IL-6 active principalement la voie de signalisation JAK/STAT (STAT1 et STAT3) et alternativement Ras/ERK1/2 MAPK. Leur ratio d'activation est déterminant pour la réponse biologique (Akira et al., 1995; Sobota et al., 2008). En effet, l'activation de la voie JAK/STAT prédomine mais dans certains cas, comme la neuroprotection exercée par l'IL-6, les 2 voies sont activées (Wang et al., 2009). Cependant, dans le SNC, la voie JAK/STAT3 est utilisée de façon majoritaire pour assurer la transduction des effets biologiques de l'IL-6 (D'Arcangelo et al., 2000; Takizawa et al., 2001; Pizzi et al., 2004; Orellana et al., 2005; Sanz et al., 2008).

CHAPITRE 3 : VOIE DE SIGNALISATION JAK/STAT3

Mise en jeu notamment par l'IL-6, la voie de signalisation JAK/STAT3 implique l'activation de tyrosines kinases JAK associées à la sous-unité gp130 qui phosphorylent des tyrosines situées sur gp130 puis sur les facteurs de transcription STAT3. La phosphorylation des STAT3s provoque leur dimérisation et leur migration dans le noyau de la cellule où ils peuvent activer la transcription de certains gènes, dont SOCS3.

La protéine SOCS3 est un des inhibiteurs endogènes de la voie JAK/STAT3 activée par l'IL-6. Elle interagit notamment avec des résidus de la sous-unité gp130, empêchant la fixation des STAT3s et leur activation par phosphorylation.

En outre, SOCS3 joue un rôle majeur dans les effets biologiques induits par la signalisation de l'IL-6 en déterminant la quantité et le type de protéines STAT activé.

1 Fonctionnement de la voie JAK/STAT3

La voie de signalisation commune JAK/STAT peut impliquer 4 tyrosines kinases, les *Janus Activated Kinases* (JAK ; JAK1 à 3, TYK2) et 7 *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT ; STAT1 à 4, STAT5A, STAT5B, STAT6) différents. Dans ce manuscrit ne sera abordée que la voie qui aboutit à l'activation de STAT3 (JAK/STAT3).

En effet, la voie JAK/STAT3 est la voie de signalisation activée de façon prépondérante par l'IL-6. Cependant, d'autres molécules activent cette voie. De fait, l'activation de la voie JAK/STAT3 peut conduire à la mise en place de différents effets biologiques, dépendants de l'agent stimulateur, de l'environnement et du type cellulaire.

1.1 Les activateurs potentiels de la voie

Bien que de nombreuses catégories de molécules (cytokines, facteurs de croissance, peptides...) puissent utiliser la voie JAK/STAT comme voie de signalisation (voir Tableau 6), certaines d'entre elles vont surtout activer STAT3. En plus de l'IL-6, le *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF), du *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) et de l'Oncostatine M (OSM) activent le facteur de transcription STAT3 via la sous-unité de transduction du signal gp130 (Taga and Kishimoto, 1997). Ces 3 cytokines ont un rôle connu dans le système nerveux. Le CNTF est un facteur de survie neuronale, dont l'expression diminue après lésion de nerf périphérique. Il a également une action activatrice sur les astrocytes et la microglie. Son rôle dans la nociception n'a pas été étudié à l'heure actuelle (Gadient and Patterson, 1999; Bauer et al., 2007). L'OSM peut être produite notamment par les macrophages, la microglie et les astrocytes activés. Après lésion de nerf périphérique, son expression est augmentée dans le nerf lésé, mais l'expression de son récepteur est diminuée dans les GRD (Chen and Benveniste, 2004). L'OSM est impliquée dans le développement de neurones de petit

Ligand	Receptor	Jak-kinase	Tyrosine Kinase	Stat Family Members
IL-6	IL-6Ra+gp130	Jak1, Jak2, Tyk2	Hck	Stat1, Stat3
IL-11	IL-11R+gp130	Jak1, Jak2, Tyk2	Src, Yes	Stat3
CNTF, CT-1, LIF, OSM	CNTFR+gp130, CT-1R+gp130, LIFR+gp130, OSMR+gp130	Jak1, Jak2, Tyk2	Src family	Predominant: Stat3 Secondary: Stat1, Stat5
G-CSF	G-CSFR	Jak2, Tyk2	Lyn	Stat3
IL-12	IL-12R β 1+IL-12R β 2	Jak2, Tyk2	Lck	Stat4
Leptin	LeptinR	Jak2	not determined	Stat3, Stat5, Stat6
IL-3	IL-3R α + β c	Jak2	Fyn, Hck, Lyn	Stat3, Stat5, Stat6
IL-5	IL5R+ β c	Jak2	Btk	Stat3, Stat5, Stat6
GM-CSF	GM-CSFR+ β c	Jak2	Hck, Lyn	Stat3, Stat5
Angiotensin	GPCR	Jak2, Tyk2		Stat1, Stat2, Stat3
Serotonin	GPCR	Jak2		Stat3
α-Thrombin	GPCR	Jak2		Stat1, Stat3
Chemokines	CXCR4	Jak2, Jak3		
IL-2	IL-2R α +IL-2R β + γ c	Jak1, Jak2, Jak3	Fyn, Hck, Lck, Syk, Tec	Stat3, Stat5
IL-4	IL-4+ γ cR	Jak1, Jak3	Lck, Tec	Stat6
IL-7	IL-7R+ γ c	Jak1, Jak3	Lyn	Stat3, Stat5
IL-9	IL-9R+ γ c	Jak1, Jak3	not determined	Stat1, Stat3, Stat5
IL-13	IL-13R+ γ c	Jak1, Jak2, Tyk2	Ctk	Stat6
IL-15	IL-15R α +IL-2R β + γ c	Jak1, Jak3	Lck	Stat3, Stat5
IL-19	IL-20R α +IL-20R β	Jak1, ?		Stat3
IL-20	IL-20R α , IL-22R+IL-20R β	Jak1, ?		Stat3
IL-21	IL-21R+ γ c			Stat1, Stat3, Stat5
IL-22	IL-22R+IL-10R β	Jak1, Tyk2		Stat1, Stat3, Stat5
IL-23	IL-12R β 1+IL-23R	Jak2	Tyk2	Stat4
IL-24	same as IL-20	Jak1, ?		Stat3
IL-26	IL-20R α +IL-10R β	Jak1, Tyk2		Stat3
IL-27	IL-27R	Jak1, Jak2, Tyk2		Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5
IL-28A, IL28B, IL29	IL-28R+IL-10R β	Jak1, Tyk2		Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5
GH	GHR	Jak2	Src family	Stat3, Stat5 (mainly Stat5a)
Tpo	TpoR (c-Mpl)	Tyk2, Jak2	Lyn	Stat1, Stat3, Stat5
Epo, Pro	EpoR, ProlactinR	Jak2	Src Family	Stat5 (mainly Stat5a)
Interferon (IFNα/β)	IFNAR1+IFNAR2	Jak1, Tyk2	Lck	Predominant: Stat1, Stat2 Secondary: Stat3, Stat4, Stat5
IFN- γ	IFN-gR1+IFN- γ R2	Jak1, Jak2	Hck, Lyn	Stat1
IL-10	IL-10R α +IL-10R β	Jak1, Tyk2	not determined	Stat3, Stat1, Stat5
EGF	EGFR	Jak1	EGFR, Src	Stat1, Stat3, Stat5
PDGF	PDGFR	Jak1, Jak2	PDGFR, Src	Stat1, Stat3, Stat5

Tableau 6 : Les activateurs potentiels de la voie JAK/STAT.

En gras, les molécules utilisant le facteur de transcription STAT3.

Tiré de : http://www.cellsignal.com/reference/pathway/jakstat_utilization.html

diamètre VR1⁺/P2X₃⁺ du GRD et de ce fait, les souris dépourvues de OSM ont une sensibilité douloureuse diminuée (Morikawa et al., 2004). A l'instar de l'IL-6, le LIF est non seulement un facteur de survie neuronale et de régénération axonale mais peut aussi activer la glie (Gadient and Patterson, 1999; Bauer et al., 2007). Après lésion de nerf périphérique, son expression est augmentée (dans les cellules de Schwann) pour recruter des neutrophiles, des macrophages et des mastocytes au site de la lésion. Dans la moelle épinière, il est surtout produit par les astrocytes et contribue à l'activation gliale (Sugiura et al., 2000). Différentes études réalisées sur le rôle du LIF dans la nociception ont montré des résultats assez contradictoires suivant les protocoles utilisés. À la périphérie, son action serait anti-algésique, tandis qu'au niveau central, elle semble pro-algésique (Bauer et al., 2007).

D'autres cytokines, bien que n'utilisant pas la gp130, peuvent activer la voie JAK/STAT3. Par exemple, la cytokine anti-inflammatoire IL-10 active cette voie par le biais de son récepteur spécifique IL-10R (Murray, 2006). L'IL-10 a fait l'objet de nombreuses recherches dans le domaine des douleurs chroniques montrant notamment que l'expression spinale de l'IL-10 est augmentée après lésion de nerf périphérique (Winkelstein et al., 2001). De plus, des approches conduisant à la production en grande quantité de l'IL-10 par injection intrathécale de plasmides ou de vecteurs viraux diminuent de façon considérable l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique chez des rats douloureux neuropathiques (Milligan et al., 2005; Milligan et al., 2005; Milligan et al., 2006). Les effets anti-algésiques de l'IL-10 peuvent être, du moins en partie, la conséquence d'une diminution des effets des cytokines pro-inflammatoires notamment de l'IL-6 via l'induction de la protéine SOCS3 (voir 2.2).

La leptine est un autre composé qui, via son propre récepteur, active la voie JAK/STAT3. Des données suggèrent que cette adipocytokine peut réguler les fonctions neuronales (Harvey, 2007). De plus, une étude récente a démontré sa contribution aux douleurs neuropathiques après lésion de nerf périphérique (Lim et al., 2009).

Différents facteurs sont ainsi susceptibles d'activer la voie JAK/STAT3. Néanmoins, les étapes d'activation de la voie se déroulent sensiblement de la même manière pour l'ensemble des activateurs potentiels que nous venons de citer.

1.2 L'activation de la voie

L'activation de la voie JAK/STAT3 respecte, dans les grandes lignes, les phases d'activation de l'ensemble des voies JAK/STAT. Elle dépend d'une série de 3 phosphorylations réalisées

par les JAK qui sont liées de manière non covalente aux récepteurs spécifiques (gp130 ou autres). La liaison du ligand à son récepteur entraîne la dimérisation ou l'oligomérisation des récepteurs conduisant à l'apposition des JAK. Ces tyrosines kinases vont s'activer par autophosphorylation, libérant ainsi leur activité catalytique intrinsèque. Dans un deuxième temps, les JAK vont phosphoryler des résidus tyrosines sur les parties intracellulaires des récepteurs. Ces résidus vont servir de site de liaison pour les domaines *Src Homology 2* (SH2) des STATs. Les facteurs de transcription STATs sont à leur tour phosphorylés sur une tyrosine et/ou une sérine spécifique(s), différente suivant la STAT concernée. Les STATs phosphorylés vont ainsi pouvoir former des homo- ou hétérodimères (ex. STAT1/STAT3) et pénétrer dans le noyau par les pores nucléaires. Grâce à leur domaine de liaison à l'ADN, les STATs vont jouer un rôle de facteur de transcription seuls ou en combinaison avec d'autres facteurs (c-jun, récepteurs aux glucocorticoïdes, récepteurs aux androgènes, ...) et activer la transcription de gènes cibles (Kisseleva et al., 2002; Levy and Darnell, 2002).

Cependant, ce paradigme de la voie de signalisation JAK/STAT énoncé dans les années 1990, rencontre depuis quelques remises en question. Par exemple, il s'avère qu'il existe dans le cytoplasme des dimères de STATs non phosphorylés qui peuvent sous forme de dimères ou de monomères passer de manière constitutive dans le noyau et y jouer aussi un rôle transcriptionnel (Brown and Zeidler, 2008 ; pour revue, voir Sehgal, 2008).

Dans le cas particulier de l'activation de la voie JAK/STAT3 par l'IL-6, quelques spécificités sont à signaler (Figure 12). Après la reconnaissance de l'IL-6 par son récepteur spécifique IL-6R α , la signalisation intracellulaire est amorcée avec la dimérisation des sous-unités gp130. La sous-unité gp130 intervient également dans l'internalisation rapide du ligand (IL-6) après activation (Heinrich et al., 1998). Le rapprochement des sous-unités gp130 va permettre l'activation des JAKs. À l'heure actuelle, il n'est pas établi qui de JAK1 ou de JAK2 est préférentiellement activée par la stimulation par l'IL-6, les 2 kinases étant associées à la gp130. Certaines données issues d'études de cellules fibrosarcomateuses suggèrent toutefois que JAK1 interviendrait en premier, permettant ainsi l'activation de JAK2 (Guschin et al., 1995). Cependant, l'utilisation de l'une ou l'autre des kinases semble très dépendante du type cellulaire étudié et de son environnement (Yu et al., 2003; Ni et al., 2004; Satriotomo et al., 2006; Yamauchi et al., 2006; Kim et al., 2007).

Les JAKs activées phosphorylent 6 résidus tyrosines sur la sous-unité gp130 qui semblent jouer chacun un rôle différent dans la signalisation de l'IL-6 (Schmitz et al., 2000). La tyr⁷⁵⁹ sert de site de liaison aux protéines inhibitrices SHP-2 et SOCS3 (voir 1.3), tandis que les

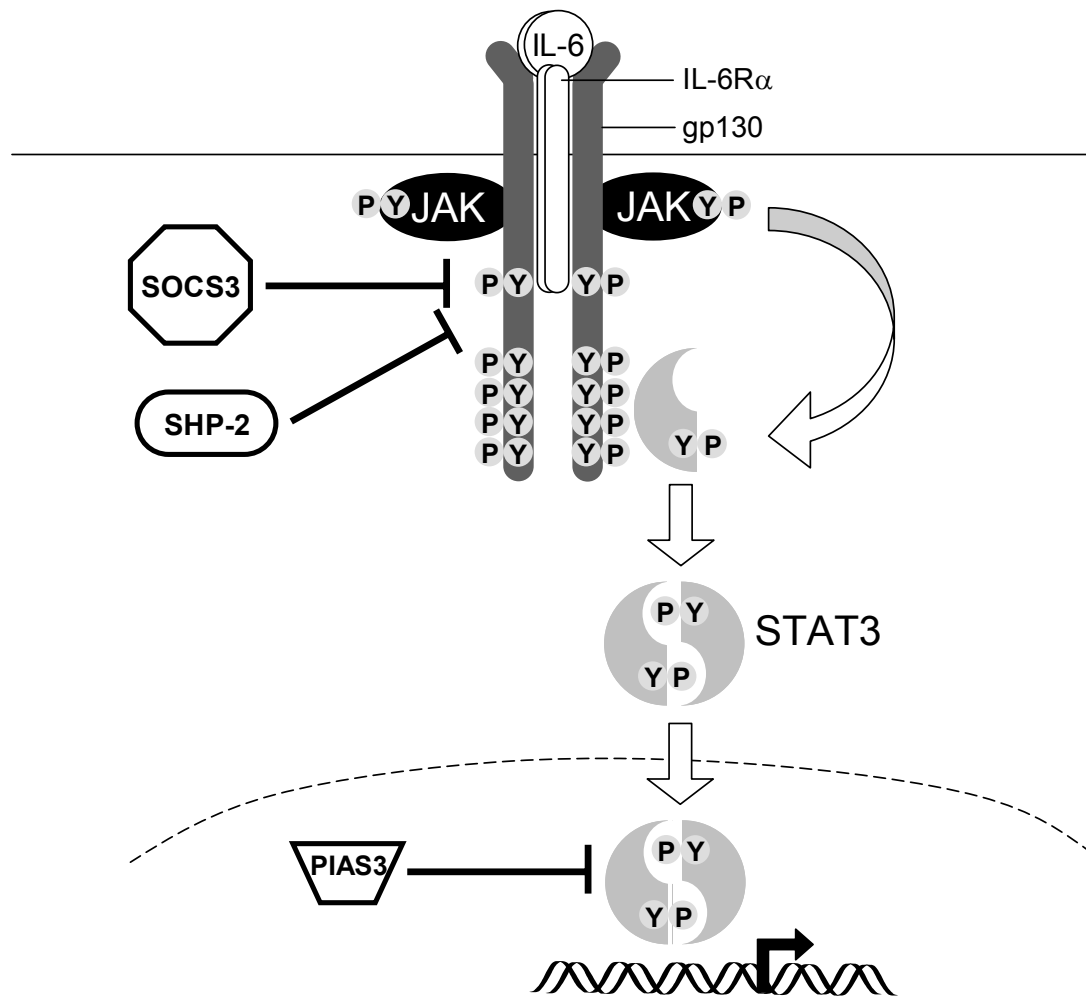


Figure 12 : Activation de la voie JAK/STAT3.

Après fixation de l'IL-6 sur son récepteur spécifique (IL-6R α), l'interaction entre IL-6R α et gp130 induit le rapprochement des JAKs associées aux sous-unités de transduction du signal (gp130) et leur activation par phosphorylation croisée. Dans un premier temps, les JAKs phosphorylent des résidus tyrosines situés sur la sous-unité gp130 (tyr 683 [non représentée], 759, 767, 814, 905, 915), dont certains servent de site de liaison à la protéine STAT3. Les JAKs phosphorylent ensuite des tyrosines (tyr⁷⁰⁵) sur les STAT3s, entraînant leur dimérisation et leur migration dans le noyau de la cellule où elles vont jouer un rôle de facteur de transcription. À ce niveau, les dimères STAT3-STAT3 se lient à des régions cibles de l'ADN, situées dans le promoteur de certains gènes et activent leurs transcriptions.

Les inhibiteurs de la voie JAK/STAT3 sont représentés en gras. SOCS3 et SHP-2 interagissent avec le même résidu tyrosine (tyr⁷⁵⁹) de la sous-unité gp130, tandis que PIAS3 intervient dans le noyau pour inhiber la liaison de STAT3 avec l'ADN.

JAK: *Janus Activated Kinase*, STAT3: *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*, SHP-2: *SH2 containing phosphatase*, SOCS3: *Suppressor of cytokine signaling 3*, PIAS3: *Protein Inhibitor of Activated Stat 3*.

autres tyrosines sont potentiellement des sites de liaison pour STAT3 (Heinrich et al., 2003). STAT3 reconnaît des tyrosines phosphorylées sur gp130 et est phosphorylée à son tour par les JAKs sur la tyr⁷⁰⁵, entraînant l'activation et la dimérisation de STAT3, puis sa translocation dans le noyau de la cellule où elle peut se lier à l'ADN. Toutefois, dans certains cas, STAT3 est aussi phosphorylée sur la ser⁷²⁷ par d'autres kinases (Decker and Kovarik, 2000). Cette phosphorylation supplémentaire permet de réguler l'activation de STAT3 et augmenterait son pouvoir transcriptionnel (Wen et al., 1995; Lufei et al., 2007). Le facteur de transcription STAT3 reconnaît la séquence palindromique TTN₅GAA de l'ADN. Cette séquence est notamment présente sur le promoteur de SOCS3, gp130, STAT3, GFAP, COX-2, IL-6 (Ehret et al., 2001). Associé avec STAT1, STAT3 peut aussi activer l'expression de *Intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1), iNOS et MCP-1 (Kim et al., 2002; Yang et al., 2005; O'Shea and Murray, 2008).

Afin de limiter les conséquences de la mise en jeu prolongée de la voie, des systèmes endogènes régulateurs sont présents constitutivement ou induits par l'activité de la voie elle-même.

1.3 La désactivation de la voie

La voie JAK/STAT joue un rôle important dans l'immunité, l'inflammation, la différenciation, la prolifération et l'oncogénèse. Ainsi, il n'est pas surprenant que différents niveaux de régulation interviennent pour limiter le degré et la durée d'activation de la voie (Figure 12). Dans le cytoplasme, les *SH2-containing phosphatases* (SHP) permettent la déphosphorylation des JAK et des résidus phosphorylés du récepteur intracellulaire. Il en existe 5 types (SHP-1, SHP-2, CD45, PTP1B et PTP des cellules T), dont certains (SHP1, SHP2, PTP1B) peuvent intervenir dans la désactivation de STAT3, phosphorylée notamment par l'IL-6 (Myers et al., 2001; Fischer et al., 2004; Lund et al., 2005; Pandey et al., 2008). Insistons sur le cas de SHP-2 qui interagit avec la tyr⁷⁵⁹ de gp130, aussi reconnue par SOCS3 (Nicholson et al., 2000; Schmitz et al., 2000). Bien qu'interagissant avec la même tyrosine, ces protéines sont responsables de 2 types d'inhibitions différents et agissent de manière indépendante et séquentielle. De fait, SHP-2 est impliquée dans l'inactivation de la signalisation induite par l'IL-6 et interviendrait de façon précoce pour l'atténuer (Lehmann et al., 2003; Fischer et al., 2004). Au contraire, SOCS3 interviendrait plus tard et jouerait davantage un rôle dans la désensibilisation de la signalisation (voir 2.2). Par ailleurs, SHP-2 assure le couplage avec la

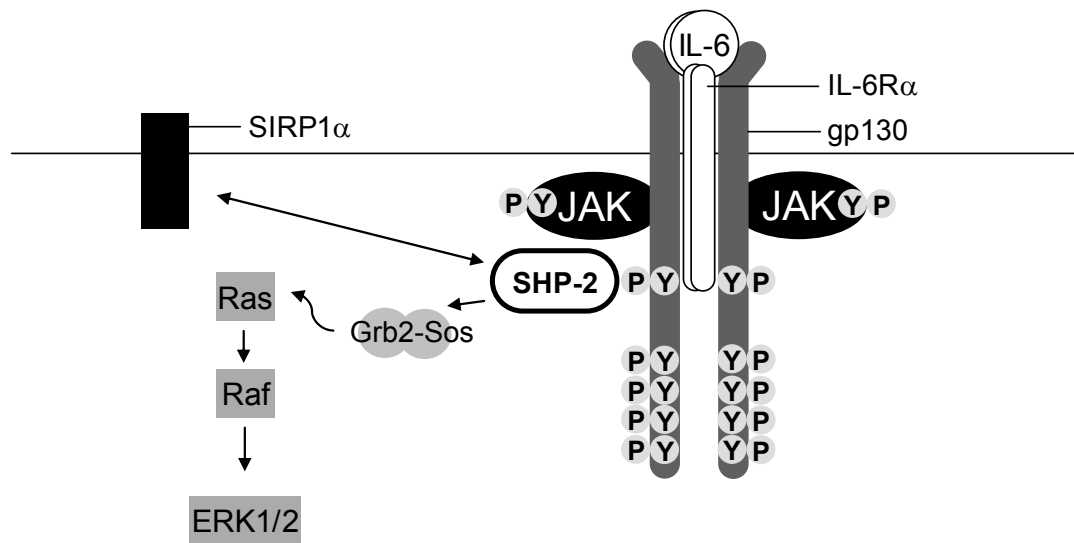


Figure 13 : Activation de la voie Ras/ERK1/2.

Après fixation de l'IL-6 sur son récepteur spécifique (IL-6R α), l'interaction entre IL-6R α et gp130 induit le rapprochement des JAKs associées aux sous-unités de transduction du signal (gp130) et leur activation par phosphorylation croisée. Dans un premier temps, les JAKs phosphorylent des résidus tyrosines situés sur la sous-unité gp130, dont la tyr⁷⁵⁹. Ce résidu sert de site de liaison à SHP-2 (et SOCS3) qui va ensuite être phosphorylée. La SHP-2 phosphorylée interagit avec Grb2 (*growth factor receptor binding protein 2*), constitutivement associé à Sos (*Son of Sevenless*), un facteur d'échange de GTP pour Ras. L'activation de Ras par ce complexe SHP-2-Grb2-Sos induit l'activation de Raf puis de ERK1/2.

L'IL-6 peut aussi induire la liaison de SHP-2 avec la protéine transmembranaire *signal regulatory protein 1 α* (SIRP1 α) qui empêche sa phosphorylation et sa capacité d'activer la voie Ras/ERK1/2, permettant une activation préférentielle de la voie JAK/STAT3.

voie Ras/ERK1/2 (Figure 13). Après stimulation par IL-6, SHP-2 est recrutée et phosphorylée par JAK1 (Schaper et al., 1998). Elle interagit ensuite avec le complexe Grb2-SOS et permet l'activation de Ras et de la voie des MAPK (Kim and Baumann, 1999; Heinrich et al., 2003). Nous avons vu que le ratio d'activation de la voie JAK/STAT3 et de celle des MAPK est déterminant pour la réponse biologique. Dans le cas d'IL-6, cet équilibre est en partie régulé par la *signal regulatory protein 1 α* (SIRP1 α) qui empêcherait la phosphorylation de SHP-2 et permettrait l'activation préférentielle de la voie JAK/STAT3 (Sobota et al., 2008).

D'autres protéines régulatrices sont présentes, comme les SHP, de façon constitutive. Ce sont les *Protein Inhibitor of Activated Stats* (PIAS). Elles interviennent essentiellement dans le noyau de la cellule en empêchant l'interaction des STATs avec l'ADN. Parmi les 5 PIAS connues actuellement (PIAS1, PIAS3, PIASX α et β , PIASy), PIAS3 interagit de façon préférentielle avec STAT3 (Chung et al., 1997; Wormald and Hilton, 2004; Rakesh and Agrawal, 2005).

À l'heure actuelle, les seules protéines régulatrices de la voie JAK/STAT dont l'expression est induite sont les *Suppressors of Cytokine Signaling* (SOCS). Découvertes en 1997, 8 protéines SOCS ont été identifiées à ce jour et interviennent de façon spécifique dans une voie de signalisation JAK/STAT donnée (voir Tableau 7). Elles peuvent agir par différents mécanismes en inactivant les JAKs, en bloquant l'accès des récepteurs aux STATs et/ou en réalisant l'ubiquitination des protéines, aboutissant à leur dégradation par le protéasome (Krebs and Hilton, 2001; Fujimoto and Naka, 2003; Ilangumaran et al., 2004; Johnston, 2004; Croker et al., 2008). Ces protéines inhibitrices endogènes interviennent dans le cytoplasme. Néanmoins, on en trouve aussi dans le noyau où elles semblent jouer le même rôle (Lee et al., 2008).

L'activation de la voie JAK/STAT3 entraîne la transcription de la protéine inhibitrice SOCS3 par association de STAT3 avec la région 5' du promoteur de SOCS3 (Auernhammer et al., 1999; He et al., 2003). De manière préférentielle *in vitro* et *in vivo*, la voie JAK/STAT3 activée par l'IL-6 est inhibée par SOCS3 (Croker et al., 2003; Lang et al., 2003; Yasukawa et al., 2003). Par conséquent, dans le contexte de notre étude, nous allons aborder plus en détails les effets de cet inhibiteur endogène.

SOCS	Rôle critique dans la signalisation de
CIS	hormone de croissance, prolactine, IL-2
SOCS1	IFN- γ , IL-2 γ c, IL-4
SOCS2	hormone de croissance
SOCS3	IL-6, LIF, G-CSF, IL-23, leptine
SOCS4	?
SOCS5	IL-4
SOCS6	Insuline
SOCS7	Insuline

Tableau 7 : Les protéines SOCS et leurs voies de signalisation spécifiques.

D'après Crocker et al., 2008

2 L'inhibiteur endogène SOCS3

Très peu présente dans les conditions basales, la protéine SOCS3 voit son expression augmenter notamment après l'activation de la voie JAK/STAT3. Son rôle d'inhibiteur endogène de cette voie intervient dans la signalisation induite par l'IL-6 mais également par le LIF, le G-CSF, l'IL-23 et la leptine (Crocker et al., 2008). Grâce à sa structure, elle est capable de réaliser l'inactivation du système JAK/STAT3 en différents points.

2.1 Structure et mode d'action

La protéine SOCS3 se compose d'un domaine SH2 entouré d'une région N-terminale comprenant la *Kinase Inhibitory Region* (KIR) et d'un domaine C-terminal appelé SOCS box (Figure 14).

Le domaine SH2, présent chez toutes les SOCS, permet d'interagir avec d'autres domaines SH2 situés sur différentes protéines (JAKs, STATs) capables de lier des résidus phosphotyrosines. Le domaine SH2 de SOCS3 peut interagir avec la tyr¹⁰⁰⁷ de la boucle d'activation de JAK2 mais surtout avec la tyr⁷⁵⁹ de gp130. En effet, il a été montré que SOCS3 interagissait préférentiellement avec la gp130, plutôt qu'avec la JAK2 (Nicholson et al., 2000). Cependant, la tyr³¹ de la KIR de SOCS3 serait capable d'agir comme un pseudo-substrat inhibiteur pour JAK2, mais, ceci ne serait possible qu'après sa liaison à la gp130 rapprochant SOCS3 de la JAK2 associée à la même gp130 (Bergamin et al., 2006).

Les régions situées de part et d'autre du domaine SH2 jouent un rôle prépondérant dans la liaison à des résidus phosphorylés. Ces régions, connues sous le nom d'*Extended SH2 Subdomains* (ESS), sont responsables du contact direct entre la boucle de liaison de la phosphotyrosine et de sa géométrie (Babon et al., 2006).

D'autre part, il existe en C-terminal du domaine SH2 une insertion de 35 résidus non structurée appelée PEST qui augmente la dégradation de SOCS3 (Babon et al., 2006).

En amont du domaine SH2, la région N-terminale comprend la lys⁶ qui peut être ubiquitinée et augmenter ainsi la dégradation de SOCS3 par le protéasome. Il existe d'ailleurs une forme tronquée de SOCS3 qui provient de la traduction à partir d'un deuxième codon initiateur et qui, de ce fait, ne possède pas la lys⁶. Cette forme, moins sensible à la dégradation, semble être produite uniquement en conditions de stress (Sasaki et al., 2003). La KIR fait aussi partie de la région N-terminale et intervient dans l'inhibition de la kinase JAK2, bien que, pour SOCS3, elle ne semble jouer qu'un rôle secondaire.

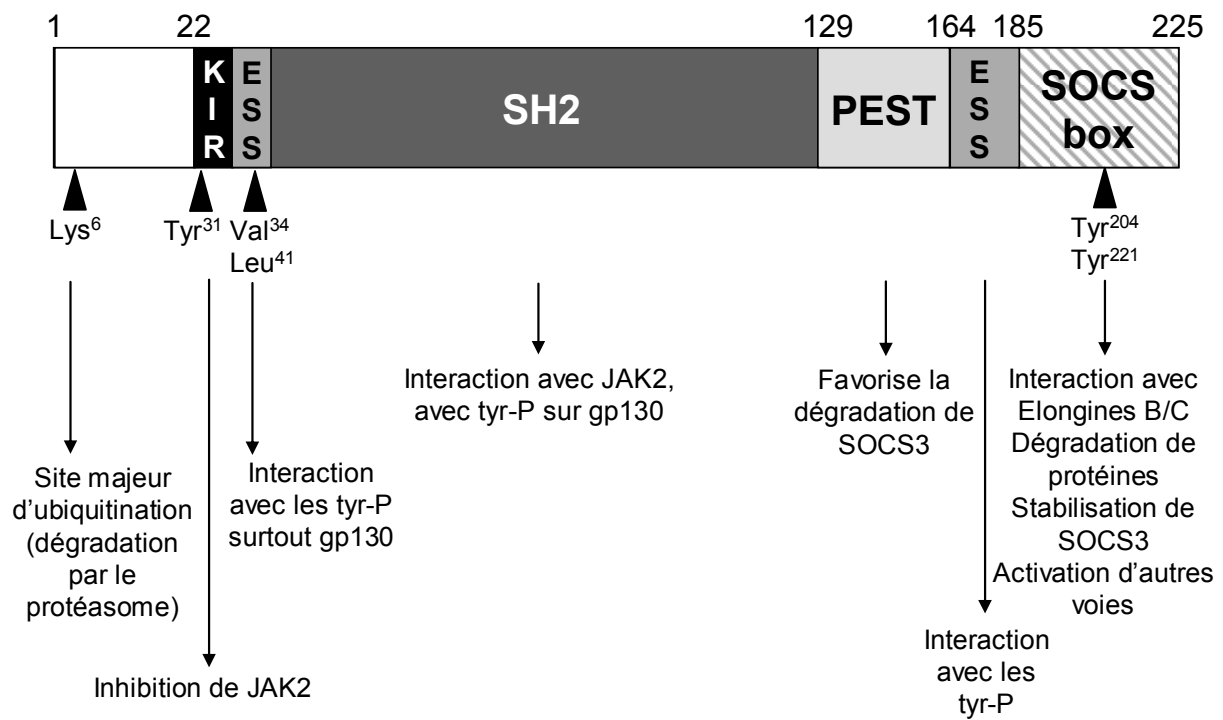


Figure 14 : Structure de SOCS3 et rôle des différentes régions.

ESS : *Extended SH2 Subdomain*, KIR : *Kinase Inhibitory Region*, SH2: *Src homology 2*, tyr-P : tyrosine phosphorylée

Enfin, en position C-terminale est située la SOCS box, composée d'environ 40 acides aminés qui forment une *BC box* et une *Cul5 box* (Piessevaux et al., 2008). La SOCS box interagit avec l'élongine C puis l'élongine B grâce à la *BC box* (Zhang et al., 1999) et la *Cul5 box* permet de recruter le complexe Cullin5/Rbx2. L'ensemble SOCS3, élongines B/C et Cullin5/Rbx2 forment une E3 ubiquitine ligase qui en association avec l'*E1 ubiquitin-activating enzyme* et l'*E2 ubiquitin-conjugating enzyme* chargées d'ubiquitiner les protéines, ciblent les protéines ubiquitinées vers le protéasome pour leur dégradation (Boyle et al., 2009). Ce système de dégradation SOCS box-dépendant pourrait intervenir dans l'inactivation de la voie JAK/STAT3. En effet, il a été montré pour une protéine très similaire à SOCS3, SOCS1, que sa SOCS box intervenait dans la dégradation de JAK2 (Kile et al., 2002; Ungureanu et al., 2002). Bien que la SOCS box de SOCS3 ne semble pas avoir d'effet sur JAK2 (Ungureanu et al., 2002), une étude récente réalisée dans des cellules ES a montré que SOCS3 formait un complexe avec JAK1 (phosphorylée et détachée du récepteur auquel elle est normalement liée) et provoquait la dégradation de la kinase par le protéasome (Boyle et al., 2009). De plus, la SOCS box de SOCS3 est impliquée dans le ciblage du récepteur au G-CSF vers la dégradation par ubiquitination d'une lysine (lys⁶³²), présente aussi sur la sous-unité gp130 (Boyle et al., 2007; Irandoust et al., 2007). L'ensemble de ces données suggèrent que SOCS3 possède, via sa SOCS box, un autre moyen d'inactiver la voie JAK/STAT3 en induisant la dégradation des protéines intervenant dans cette voie de signalisation et modifiant ainsi leur demi-vie (Siewert et al., 1999). Ce mécanisme de dégradation semble toutefois indépendant de la régulation de STAT3 exercée par SOCS3 (Boyle et al., 2009).

La SOCS box joue également un rôle dans la stabilité de la protéine SOCS3 elle-même. En effet, la phosphorylation des tyr²⁰⁴ et tyr²²¹, situées dans la SOCS box mais en dehors des zones de liaison à l'élongine C, déstabilise le contact avec l'élongine et diminue la demi-vie de SOCS3 (Haan et al., 2003).

En plus de son rôle dans la dégradation de protéines, la SOCS box de SOCS3 a une fonction d'adaptateur pour activer d'autres voies de signalisation. Par exemple, la phosphorylation des tyr²⁰⁴ et tyr²²¹ induite par différents facteurs de croissance, provoque la liaison de SOCS3 avec p120RasGAP qui active la voie Ras/ERK1/2 et permet la prolifération et la survie cellulaire (Cacalano et al., 2001). Par ailleurs, SOCS3, après phosphorylation sur la tyr²²¹, recrute les protéines adaptatrices Nck et Crk-L, connues pour coupler les récepteurs activés à différentes voies de signalisation et au cytosquelette d'actine (Sitko et al., 2004). Ainsi, outre son rôle dans la régulation de la voie JAK/STAT3, SOCS3 exerce bien d'autres fonctions impliquées

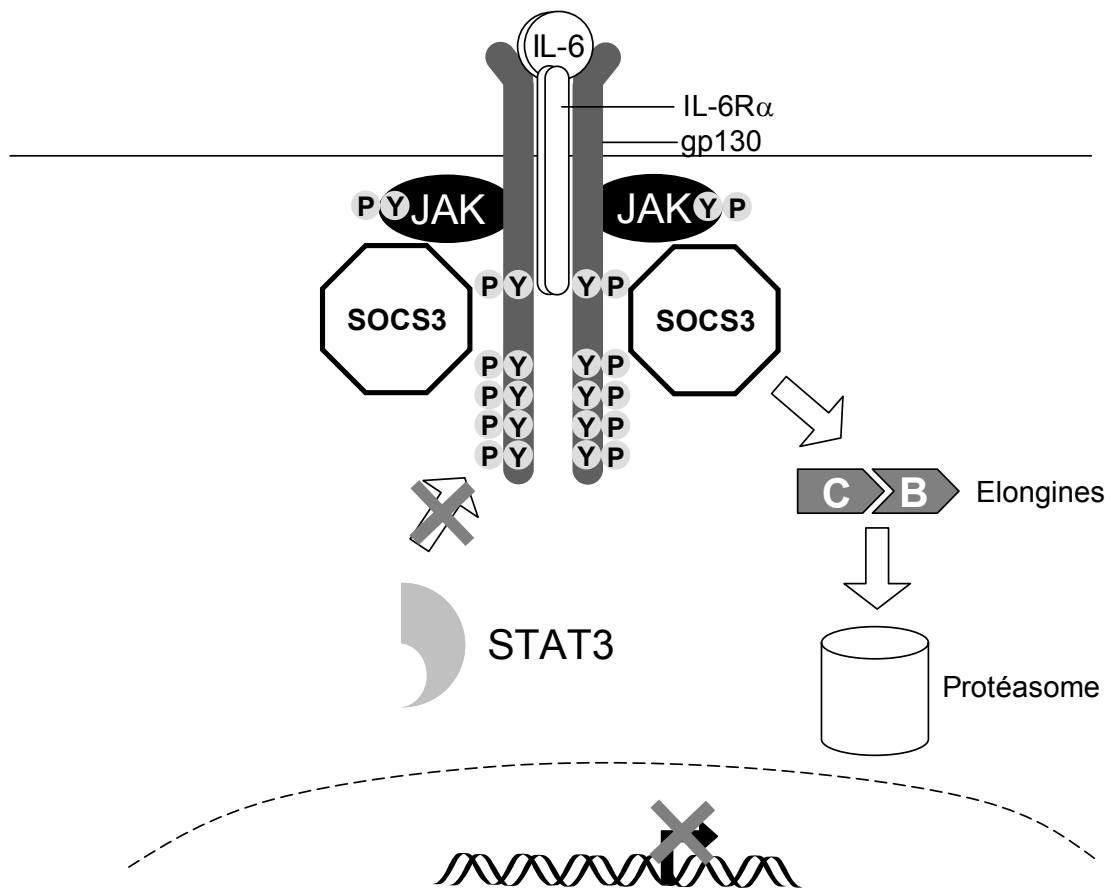


Figure 15 : Inhibition de la voie JAK/STAT3 par SOCS3.

Le mécanisme principal, actuellement identifié, de l'inhibition exercée par SOCS3 est réalisé par sa fixation à la tyr⁷⁵⁹ de gp130. Cette interaction empêche la fixation de STAT3 aux autres tyrosines phosphorylées de gp130, probablement par encombrement stérique. SOCS3 peut également interagir secondairement avec la boucle d'activation de la JAK. Enfin, SOCS3 pourrait accélérer la dégradation de gp130 ou des JAKs par la voie du protéasome, via son interaction avec les élongines B et C.

dans la signalisation ou la régulation du cycle cellulaire (Masuhiro et al., 2008; Sitko et al., 2008).

L'étude de la structure de SOCS3 et des interactions avec les JAKs et STAT3 ont permis de dévoiler certains aspects de l'inactivation de la voie JAK/STAT3 exercée par SOCS3 (Figure 15). Il en ressort que le mécanisme majeur est la fixation de SOCS3 à la tyr⁷⁵⁹ de gp130 qui pourrait gêner l'interaction de STAT3 avec les tyrosines de gp130 et inhiber la voie. SOCS3 pourrait également augmenter la dégradation des différents composants de la voie JAK/STAT3. De nombreuses études ont démontré son rôle dans la dégradation des protéines (Rui et al., 2002; Liu et al., 2003; Orr et al., 2007a, 2007b), à l'heure actuelle, seules les quelques données abordées précédemment suggèrent l'implication de SOCS3 dans le catabolisme de certaines protéines de la voie JAK/STAT3 après son activation par l'IL-6.

Soulignons que d'autres protéines associées à SOCS3 semblent nécessaires pour inhiber la signalisation de l'IL-6. C'est le cas de *microtubule-associated protein 1S* (MAP1S) qui maintient SOCS3 dans le cytoplasme et lui permet d'interagir avec les microtubules. Cette interaction est indispensable à l'inhibition de la signalisation de l'IL-6 par SOCS3 (Zou et al., 2008).

En plus d'inhiber la voie JAK/STAT3 mise en jeu par l'IL-6, SOCS3 joue un rôle supplémentaire dans le contrôle des effets biologiques induits par l'IL-6.

2.2 Contrôle des effets biologiques de l'IL-6

En réponse à l'activation de la voie JAK/STAT3 par l'IL-6, l'expression de la protéine inhibitrice SOCS3 est rapidement induite. Cette production et accumulation rapide de SOCS3 permet la désensibilisation de la voie stimulée par l'IL-6 : il n'y aura pas de réponse à la stimulation par l'IL-6, juste après une première stimulation. Ceci a également été observé pour les récepteurs de la même cellule qui n'ont pas été activés lors de la première stimulation (trans-désensibilisation). Ce phénomène rend probablement compte de la cinétique biphasique de phosphorylation de STAT3 observée après stimulation par IL-6 (Fischer et al., 2004; Wormald et al., 2006).

En dehors de la désensibilisation de la signalisation de l'IL-6, SOCS3 joue un rôle majeur dans le contrôle des effets biologiques de l'IL-6. En effet, IL-6, cytokine pro-inflammatoire et IL-10, cytokine anti-inflammatoire activent toutes deux, la même voie de signalisation

JAK/STAT3 (voir 1.1). Comment peut-on expliquer que la mise en jeu d'une même voie aboutisse à des effets biologiques totalement opposés ?

Il a été montré, du moins dans les macrophages, que l'absence de SOCS3 permet à l'IL-6 d'exercer les mêmes effets biologiques que l'IL-10 (Yasukawa et al., 2003). De plus, SOCS3 peut agir uniquement sur la phosphorylation de STAT3 induite par l'IL-6 et non celle induite par IL-10. De fait, SOCS3 interagit avec les résidus tyrosines de la gp130 mais pas avec ceux du récepteur à l'IL-10 (Niemand et al., 2003; Murray, 2006). Ainsi, IL-10 et IL-6 peuvent activer une réponse anti-inflammatoire, mais seulement celle de l'IL-6 est bloquée par SOCS3.

À l'heure actuelle, l'implication de SOCS3 dans la dualité des effets IL-6/IL-10 est bien admise. Cependant, le mécanisme exact par lequel SOCS3 modifie la réponse biologique de l'IL-6 n'a pas été, pour l'instant, clairement établi (Murray, 2006, 2007; Williams et al., 2007; O'Shea and Murray, 2008).

D'autre part, la présence de SOCS3 se révèle aussi importante pour contrôler l'activation d'une réponse de type IFN γ , après stimulation par IL-6. En effet, l'IFN γ active préférentiellement JAK1 et STAT1. Cependant, en absence de SOCS3, l'IL-6 induit une phosphorylation soutenue de STAT3 mais aussi de STAT1 et, de ce fait, active également des gènes de réponse à l'IFN γ (Lang et al., 2003). Ainsi, il apparaît que la présence de SOCS3 permet de réguler la quantité et le type de STAT activé en réponse à l'IL-6.

Le contrôle de la signalisation de l'IL-6 peut être assuré par différents facteurs qui vont induire l'expression de SOCS3. C'est le cas de l'IL-10 qui active, comme nous l'avons déjà évoqué, l'expression de SOCS3 via la voie JAK/STAT3. La protéine SOCS3 est responsable d'une partie des effets anti-inflammatoires de l'IL-10 (Berlato et al., 2002). L'IFN γ peut également induire l'expression de SOCS3 par JAK1 et STAT1 (Croker et al., 2003).

En dehors de la voie JAK/STAT, l'activation de la p38 MAPK induite par le TNF α , le lipopolysaccharide ou l'IL-4 peut participer à la modulation de la signalisation de l'IL-6 en induisant l'expression de SOCS3 ou en stabilisant les ARNm SOCS3 (Bode et al., 1999; 2001; Canfield et al., 2005; Ehling et al., 2007).

Les données évoquées dans ce chapitre soulignent le rôle déterminant qu'exerce la protéine SOCS3 dans la signalisation de l'IL-6. De fait, SOCS3 contrôle non seulement la durée mais également le type de signalisation mise en jeu par cette cytokine. Ces propriétés remarquables ont d'ailleurs été exploitées à des fins thérapeutiques dans différents modèles animaux de pathologies inflammatoires (Shouda et al., 2001; Jo et al., 2005; Ronn et al., 2008).

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Les lésions de nerf périphérique, souvent à l'origine des douleurs chroniques, induisent l'activation des cellules gliales dans la moelle épinière qui s'accompagne de la production et de la libération de différents médiateurs algogènes. Comme nous l'avons souligné dans les rappels bibliographiques, les cytokines pro-inflammatoires font partie de ces molécules libérées qui participent à l'hypersensibilité douloureuse après lésion. Plus particulièrement, l'IL-6 a une action pro-nociceptive qui pourrait en partie s'expliquer par sa capacité à activer les cellules microgliales. Nous avons vu que l'IL-6 pouvait exercer ses effets biologiques en grande partie par la mise en jeu de la voie de signalisation JAK/STAT3.

Afin de déterminer les relations éventuelles entre l'IL-6 spinale, le développement des douleurs neuropathiques et la mise en jeu de la voie de signalisation JAK/STAT3, nous avons utilisé différents types de lésion de nerf périphérique et :

- étudié l'état d'activation de la voie JAK/STAT3 dans la moelle épinière (objectif 1)
- recherché l'implication de la voie JAK/STAT3 dans l'activation microgliale et l'hypersensibilité douloureuse (objectif 2)

Pour répondre à ces 2 objectifs, nous avons,

- (1) Déterminé le décours temporel, le lieu d'activation de la voie JAK/STAT3 et les types cellulaires concernés dans la moelle épinière après lésion de nerf périphérique (article 1)
- (2) Tenté de bloquer la voie JAK/STAT3 avec un agent pharmacologique, délivré par voie intrathécale et étudié, ensuite, son impact sur l'activation microgliale et l'hypersensibilité douloureuse (article 1)
- (3) Après avoir montré que la lésion de nerf périphérique se traduisait par l'activation de la voie JAK/STAT3 quasi-exclusivement dans la microglie spinale, nous avons essayé de l'inhiber plus spécifiquement, localement et surtout de façon ciblée dans la glie. Nous avons ainsi développé un vecteur lentiviral surproduisant la protéine inhibitrice endogène SOCS3 et l'avons injecté dans la corne dorsale de la moelle épinière (article 2).

RÉSULTATS

ARTICLE 1

La voie JAK/STAT3 est activée dans la microglie spinale après lésion de nerf périphérique et contribue au développement de la douleur neuropathique chez le rat.

La lésion de nerf périphérique aboutit, au niveau de la moelle épinière, à des changements plastiques et à la libération de différents médiateurs algogènes. Parmi ces derniers, les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle pro-nociceptif en agissant à la fois sur les neurones et les cellules gliales. L'IL-6, plus particulièrement, participe à l'hypersensibilité douloureuse, probablement, en partie, par sa capacité à activer la microglie. Dans le SNC, elle exerce ses effets biologiques notamment au travers de la voie de signalisation JAK/STAT3.

Malgré les nombreuses données attestant du rôle important de l'IL-6 dans le développement des douleurs chroniques après lésion de nerf périphérique, la mise en jeu éventuelle de la voie JAK/STAT3 dans la moelle épinière n'avait pas encore été démontrée.

Par conséquent, la première partie de notre travail a consisté à apprécier l'état d'activation de la voie JAK/STAT3 dans la moelle épinière après lésion de nerf périphérique. Dans ce but, nous avons utilisé deux modèles différents de lésion de nerf périphérique : un modèle purement lésionnel, la section complète du nerf sciatique (SNT, non présenté dans l'article 1) et un modèle validé de douleur neuropathique, la ligature serrée des nerfs spinaux L5 et L6 (SNL). Dans ces deux modèles, nous avons étudié le décours temporel de l'accumulation de la forme phosphorylée (active) de STAT3 et d'ARNm codant la protéine inhibitrice endogène SOCS3, dont l'expression est placée sous contrôle transcriptionnel de STAT3. Nous avons également déterminé dans quel(s) type(s) cellulaire(s) était présente la forme phosphorylée de STAT3. Les résultats complémentaires obtenus après SNT sont présentés dans les encarts.

Dans un second temps, nous avons tenté de bloquer la phosphorylation de STAT3 après SNL à l'aide d'un inhibiteur de JAK2 (responsable de la phosphorylation de STAT3), AG490 administré par voie intrathécale. L'impact de l'inhibition de la voie JAK/STAT3 a été évalué sur l'activation microgliale et sur l'hypersensibilité douloureuse après SNL.

À l'aide d'anticorps spécifiques de la forme phosphorylée (active) de STAT3 (p-tyr⁷⁰⁵STAT3), nous avons suivi le décours de la phosphorylation de STAT3 après SNL par western blot. Dans la corne dorsale ipsilatérale à la lésion, la protéine STAT3 est

phosphorylée dès 24h et jusqu'à 15j après SNL. Du côté contralatéral, la quantité de la forme phosphorylée de la protéine STAT3 n'est pas modifiée de manière significative.

Afin de déterminer le(s) type(s) cellulaire(s) concerné(s), nous avons réalisé des expériences de co-marquage à l'aide d'anticorps dirigés contre des « marqueurs » neuronaux et gliaux sur des coupes de moelles épinières de rats SNL, 48h après lésion. La forme phosphorylée de STAT3 est présente quasi-exclusivement dans les cellules microgliales immunomarquées pour ITGAM ou Iba1. L'immunomarquage MAP2 (neurones) et GFAP (astrocytes) montre une absence de co-localisation avec pSTAT3-IR. Toutefois, l'utilisation d'un autre marqueur neuronal, NeuN, a permis la détection de quelques rares neurones également positifs pour pSTAT3 (non présenté).

De façon comparable, ces expériences ont été réalisées en utilisant le second modèle de lésion de nerf périphérique, la section complète du nerf sciatique (SNT). Après exposition du nerf sciatique, deux ligatures serrées (*chromic catgut*) sont posées au milieu du nerf, distantes d'environ 1 mm et le nerf est sectionné entre ces 2 ligatures. Les animaux *sham* subissent la même chirurgie à l'exception de la ligature et la section du nerf. Quarante-huit heures après lésion, l'immunomarquage des coupes de moelles épinières montrent des résultats similaires à ceux obtenus après SNL (Figure 1).

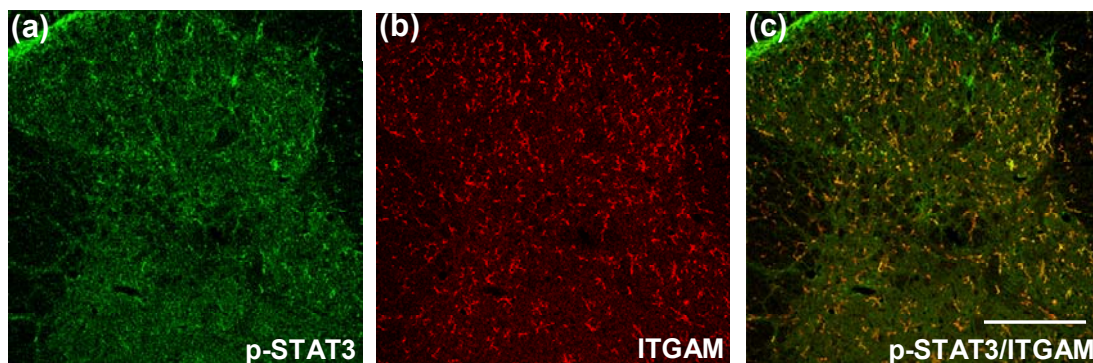
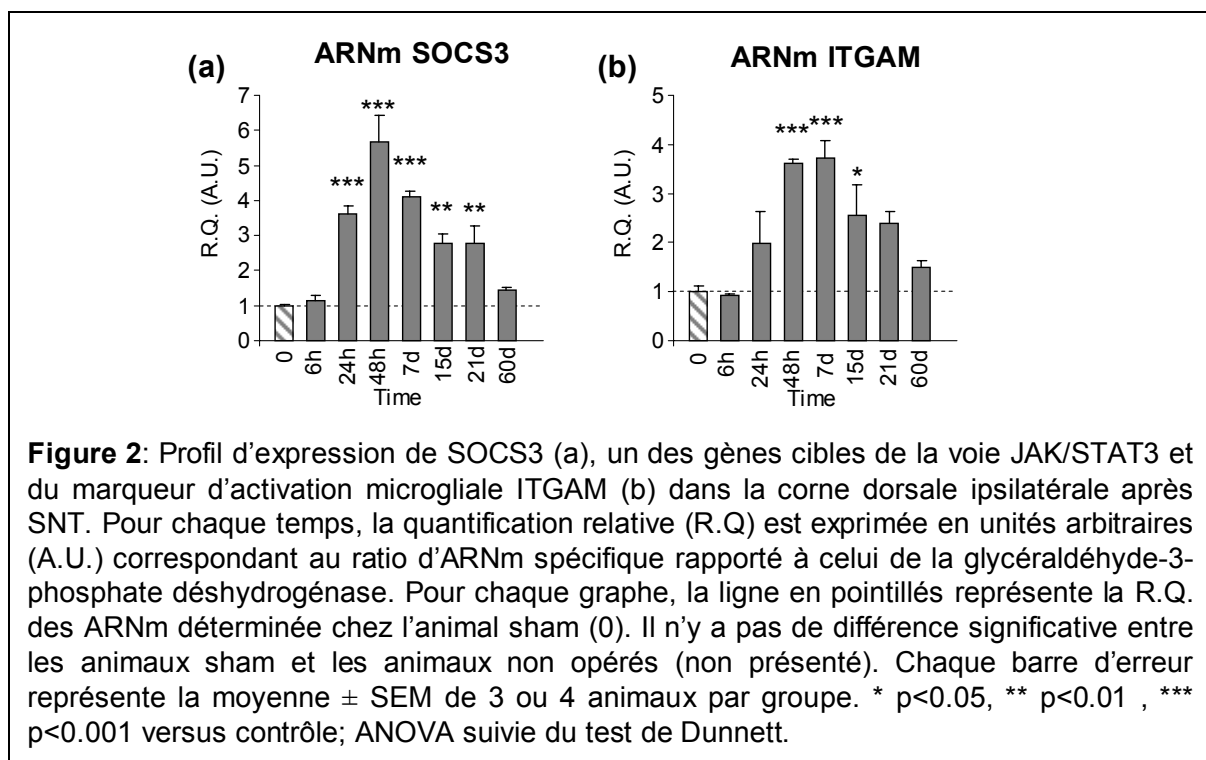


Figure 1: Après SNT, l'activation de la voie JAK/STAT3 a lieu majoritairement dans la microglie de la corne dorsale ipsilatérale de la moelle épinière. Quarante-huit heures après SNT, les animaux sont sacrifiés et préparés pour l'immunohistofluorescence. Les coupes de tissus (20µm) sont incubées avec des anticorps anti-pSTAT3 (en vert, a) et anti-ITGAM (en rouge, b). Après SNT, dans la partie dorsale de la moelle épinière, le marquage pSTAT3 est détecté uniquement du côté ipsilatéral à la lésion (a). La lésion induit aussi du même côté une activation microgliale comme l'atteste la forte hausse de ITGAM-IR. Les expériences de co-localisation ont révélé que la majorité des cellules pSTAT3+ étaient aussi ITGAM+ (c). Barre d'échelle = 100µm.

L'activation de la voie JAK/STAT3 se traduit également par une augmentation de l'expression de certains gènes cibles. En particulier, nous avons mesuré les concentrations d'ARNm SOCS3 et COX-2 par RT-PCR semi-quantitative en temps réel à différents temps après SNL. Celle de SOCS3 augmente dès 24h après SNL et reste élevée 48h après lésion, avant un retour à son niveau de base à 7j. En ce qui concerne COX-2, son expression est induite plus tôt (dès 6h) et suit ensuite le même déroulement temporel que SOCS3.

L'activation de la voie JAK/STAT3 ayant lieu très majoritairement dans la microglie, nous avons également étudié l'expression d'ITGAM, dont l'augmentation est considérée comme l'un des indicateurs de l'activation microgliale. Après SNL, la concentration d'ARNm ITGAM est augmentée en même temps que l'activation de la voie JAK/STAT3 (24h) et se maintient jusqu'à 21j après lésion.

Parallèlement, l'expression de SOCS3 et d'ITGAM a été aussi évaluée après SNT. La concentration des ARNm de SOCS3 est augmentée significativement dès 24h, atteint un maximum à 48h et reste élevée jusqu'à 21j après SNT. Celle d'ITGAM augmente de manière significative à 48h et persiste élevée jusqu'à 15j après SNT (Figure 2).

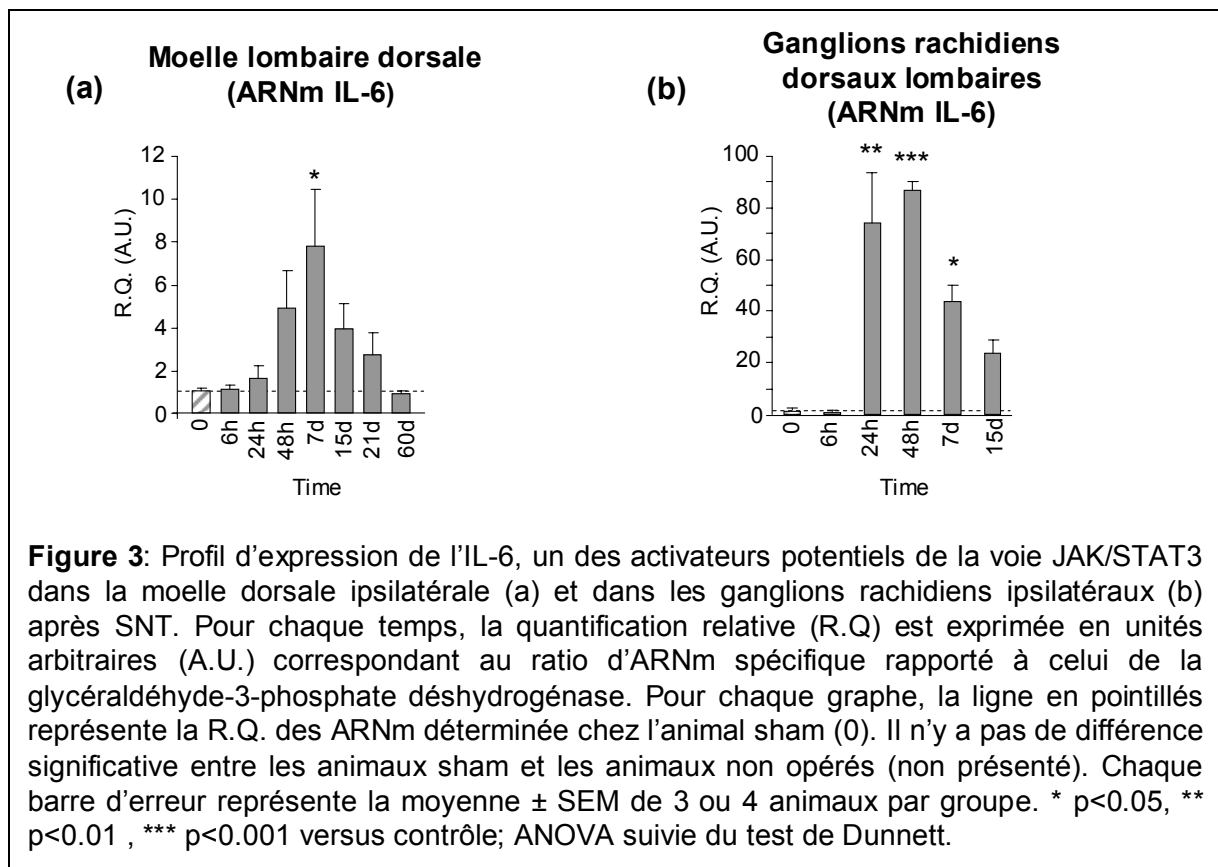


Afin de déterminer le lien possible entre l'IL-6 et l'activation de la voie JAK/STAT3 observée au niveau spinal chez les rats SNL, nous avons, dans un premier temps, étudié l'expression de l'IL-6 dans la moelle épinière dorsale et les GRD lombaires (L4, L5, L6)

ipsilatéraux à la lésion. Dans la moelle dorsale, la concentration d'ARNm IL-6 n'est augmentée qu'entre 7j et 15j après la lésion. En revanche, dans les GRD, une hausse importante de la concentration d'ARNm IL-6 est observée dès 6h après la lésion et persiste ensuite très élevée pendant 15j.

Pour vérifier que l'IL-6 massivement produite dans les GRD pourrait participer à l'activation de la voie JAK/STAT3 dans la moelle épinière, nous avons mesuré la concentration de la protéine IL-6 dans la partie dorsale de la moelle épinière ipsilatérale 48h après SNL. Nous avons choisi précisément ce délai après l'altération du nerf parce que l'expression d'IL6 n'a pas encore augmenté dans la moelle épinière alors que la forme phosphorylée de STAT3 y est déjà présente. Les données montrent que la concentration de la protéine IL-6 est effectivement significativement augmentée dans la moelle épinière dorsale ipsilatérale 48h après SNL.

De façon similaire, après SNT, l'expression de l'IL-6 n'est augmentée significativement que 7j après section du nerf dans la moelle épinière dorsale ipsilatérale. Dans les GRD lombaires (L4, L5, L6), l'expression de l'IL-6 est augmentée plus tôt, à partir de 24h après lésion et se maintient jusqu'à 7j (Figure 3).



Pour mettre en évidence l'implication directe de l'IL-6 dans l'activation de la voie JAK/STAT3 spinale, nous avons immunoneutralisé l'IL-6 libérée au niveau spinal à l'aide d'anticorps anti-IL-6 administrés par voie intrathécale chez des rats SNL. Ce traitement est capable d'inhiber en grande partie la phosphorylation de STAT3 induite par la lésion, 48h après SNL, confirmant ainsi le rôle majoritaire de l'IL-6 dans l'activation de la voie 48h après SNL.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons tenté de réduire, par un traitement préventif, l'activation de la voie JAK/STAT3 spinale et d'en apprécier les conséquences sur le développement de la douleur après l'altération (SNL) des projections centrales du nerf sciatique. Nous avons administré par voie intrathécale un inhibiteur de la kinase JAK2, l'AG490. L'injection de l'AG490 diminue la phosphorylation de STAT3 et l'expression de SOCS3 chez des rats SNL 48h après la lésion. Toutefois, le traitement n'a apparemment aucun impact sur l'immunoréactivité ITGAM (qui témoigne de l'activation microgliale).

Nous avons ensuite étudié les répercussions de l'inhibition de la voie JAK/STAT3 par l'AG490 sur l'hypersensibilité douloureuse. Le traitement avec l'AG490 diminue l'allodynie mécanique de façon significative du côté ipsilatéral mais également contralatéral à la lésion. Sept jours après lésion, c'est-à-dire 5 jours après l'arrêt du traitement, l'allodynie mécanique reste diminuée chez les rats SNL traités avec l'AG490. En ce qui concerne l'hyperalgésie thermique, le traitement par l'AG490 augmente de façon significative les seuils de réponse à la chaleur du côté ipsilatéral à la lésion. En revanche, aucune différence significative n'est observée 7j après lésion. L'utilisation d'une dose plus forte d'AG490 (5µg) n'améliore pas de façon significative l'effet anti-allodynique ou anti-hyperalgésique du traitement.

Dans un modèle bien caractérisé de douleur neuropathique (SNL) et dans un modèle lésionnel (SNT), nous avons montré que la voie JAK/STAT3 était activée dans la moelle épinière après lésion. Dans les 2 modèles étudiés, l'activation a lieu de façon précoce (dès 24h) majoritairement dans la microglie, et, en de très rares cas, dans les neurones. Cette observation a été réalisée 48h après lésion, au moment où l'accumulation dans le tissu de la forme phosphorylée de STAT3 est la plus forte. Cependant, on ne peut exclure, qu'à d'autres temps où la pSTAT3-IR est aux limites de la détection par immunofluorescence, l'activation de la voie ait lieu dans d'autres types cellulaires. D'autre part, malgré une certaine corrélation temporelle et spatiale entre l'activation de la voie JAK/STAT3 et l'activation de la microglie, la voie JAK/STAT3 ne semble pas participer à l'activation microgliale, du moins celle que

l'on estime au travers du marqueur ITGAM. En effet, le blocage de la voie par l'inhibiteur de JAK2, AG490, ne modifie pas l'expression de l'ARNm ITGAM (non présenté) ni l'immunoréactivité ITGAM.

L'IL-6 joue un rôle majoritaire dans l'activation de la voie JAK/STAT3. En effet, l'activation de la voie coïncide avec une augmentation de l'expression de l'IL-6 dans les GRD lésés, dans les deux modèles étudiés. De plus, l'immunoneutralisation de l'IL-6 chez les rats SNL diminue la phosphorylation de STAT3. D'autres cytokines de la famille IL-6 sont aussi capables d'activer la voie de signalisation JAK/STAT3. Toutefois, même si l'expression du CNTF n'est pas modifiée après SNL, l'expression du LIF est légèrement augmentée dans les GRD et pourrait aussi participer, bien que probablement de façon minoritaire, à l'activation de la voie JAK/STAT3 dans la moelle épinière (non présenté).

Dans le modèle de douleur neuropathique étudié (SNL), le blocage de la voie JAK/STAT3 par l'injection intrathécale d'AG490 diminue l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique. En ce qui concerne l'allodynie mécanique, les effets de l'injection d'AG490 se prolongent à distance du traitement, c'est-à-dire 5j après l'arrêt de celui-ci, suggérant que l'activation précoce de la voie JAK/STAT3 pourrait participer à la mise en place de l'hypermécanosensibilité de l'animal aux stimulations mécaniques.

En conclusion, dans deux modèles différents de lésion d'un nerf périphérique, la voie JAK/STAT3 est activée de façon précoce et très localisée (sites de projections des afférences lésées, non présenté). Par ailleurs, bien que cette activation ait lieu de façon très majoritaire, dans les deux modèles, dans les cellules microgliales, la voie JAK/STAT3 ne semble pas être impliquée dans l'activation microgliale. Ainsi, la participation de l'IL-6 à l'activation microgliale suggérée dans différentes études ne semble pas impliquer la voie JAK/STAT3.

En revanche, il apparaît clairement que la mise en jeu de la voie JAK/STAT3 participe à la genèse de l'hypermécanosensibilité douloureuse qui se développe après lésion de nerf périphérique.

JAK/STAT3 pathway is activated in spinal cord microglia after peripheral nerve injury and contributes to neuropathic pain development in rat

Elisa Dominguez, Cyril Rivat, Blandine Pommier, Annie Mauborgne and Michel Pohl

INSERM, UMR S 713, Paris, France

Université Pierre et Marie Curie – Paris VI, Paris, France

Abstract

Peripheral nerve lesion leads to the production of interleukin 6 (IL-6)-related neuropoietic cytokines involved in nerve protection and regeneration. This family of cytokines mainly signal through the signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway that is locally activated in injured nerves. IL-6 is also involved in pain that frequently arises from peripheral nerve lesion. We investigated the possible activation of this major IL-6 signaling system in the spinal cord after peripheral nerve injury and its role in neuropathic pain. Ligation of L5–L6 spinal nerves (SNL) evoked an accumulation of active, phosphorylated form of STAT3 in microglial cells of dorsal spinal cord mostly in projection areas of injured nerves. SNL resulted also in a massive induction of IL-6 mRNA expression

in dorsal root ganglia and increased concentration of IL-6 in dorsal spinal cord. Intrathecal injection of anti-rat IL-6 antibodies prevented the SNL-induced accumulation of phospho-STAT3 in the spinal cord. STAT3 pathway blockade with Janus kinase 2 inhibitor AG490 attenuated both mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in SNL rats. These data show that in response to SNL injury Janus kinase/STAT3 system is activated mainly through IL-6 signaling in spinal microglia and that this transduction pathway participates in development of pain associated with nerve alteration. **Keywords:** Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3, neuropathic pain, peripheral nerve injury, spinal cord microglia.

J. Neurochem. (2008) **107**, 50–60.

Peripheral nerve injury results in a particular pattern of expression of genes involved in early signaling and regenerative process. Among them, numerous cytokines take part in this neuronal answer. In particular, the interleukin 6 (IL-6) family of cytokines is implicated in the protection and survival of injured nerves (for review see Cafferty *et al.* 2001, 2004; Bauer *et al.* 2007). Accumulating data support also the role of IL-6 in pain that frequently develops after peripheral nerve alteration and is associated with activation of glial cells in the spinal cord. Production of IL-6 is consistently induced after different types of peripheral nerve lesion, both in injured nerves and in the spinal cord (Arruda *et al.* 1998; Murphy *et al.* 1995; Winkelstein *et al.* 2001; for review see De Jongh *et al.* 2003). Through its specific receptor gp80 and the shared gp130 subunit, IL-6 mainly activates the Janus-activated kinase–signal transducer activator of transcription (JAK/STAT) transduction pathway. In addition, IL-6 may also signal via the mitogen-activated protein kinase cascade. IL-6 induces JAK1- and especially JAK2-mediated phosphorylation (Taga and Kishimoto 1997) of STAT1 and STAT3 proteins. In the CNS, STAT3 plays an

essential role in IL-6 signaling (for reviews see Imada and Leonard 2000; Heinrich *et al.* 2003; Sanz *et al.* 2008). STAT3 is thus implicated in the transcription control of numerous genes including glial fibrillary acidic protein (GFAP), gp130, cyclooxygenase-2 (COX-2), and suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) (Ehret *et al.* 2001; He *et al.* 2003), the product of the latter gene acting in most cell types

Received January 11, 2008; revised manuscript received June 16, 2008; accepted June 16, 2008.

Address correspondence and reprint requests to Michel Pohl, INSERM U713, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, 91, boulevard de l'Hôpital, 75634 Paris Cedex 13, France. E-mail: pohl@ext.jussieu.fr

Abbreviations used: ACSF, artificial CSF; CNTF, ciliary neurotrophic factor; COX-2, cyclooxygenase-2; DRG, dorsal root ganglia; GFAP, glial fibrillary acidic protein; IHC, immunohistochemistry; IL-6, interleukin 6; ITGAM, Integrin alpha M; JAK, Janus kinase; LIF, leukemia inhibitory factor; MAP, microtubule-associated protein 2; PBS, phosphate-buffered saline; PBS-T, phosphate-buffered saline containing Tween 20; p-STAT3-IR, p-STAT3 immunoreactive material; PWL, paw-withdrawal latency; SDS, sodium dodecyl sulfate; SNL, spinal nerve ligation; SOCS3, suppressor of cytokine signaling 3; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3.

as a feedback inhibitor of JAK/STAT3 pathway (Miao *et al.* 2006; for review see Fujimoto and Naka 2003).

The JAK/STAT3 pathway is activated after injury of both central and peripheral nerves. Spinal cord traumatic injury leads to a rapid phosphorylation of STAT3 in the spinal cord parenchyma (Yamauchi *et al.* 2006) and sciatic nerve transection results in an activation of JAK/STAT3 pathway locally in the nerve. Indeed, the phosphorylated form of STAT3 is present in sensory nerve soma in dorsal root ganglia (DRG) and motor neurons in the ventral spinal cord (Lee *et al.* 2004; Qiu *et al.* 2005). In peripheral nerves, the JAK/STAT3 signaling pathway participates in the local response to nerve injury and in axonal regeneration (Schwaiger *et al.* 2000; Sheu *et al.* 2000; Qiu *et al.* 2005).

Despite the potent effect of IL-6 on spinal glia and its globally pro-nociceptive role following peripheral nerve alteration, no data are available concerning the activity state of the JAK/STAT3 pathway in the dorsal spinal cord after lesion of peripheral nerves and its possible participation in resulting neuropathic pain.

In this study, we investigated whether JAK/STAT3 signaling activity in the dorsal spinal cord might be modified after spinal nerve ligation (SNL), this type of nerve injury representing a widely used model of neuropathic pain (Kim and Chung 1992). We studied the STAT3 phosphorylation status, identified the cell type(s) that contain activated STAT3, and evaluated the expression profile of the main possible activators of this pathway and of the STAT3 target genes COX-2 and SOCS3. We then investigated whether immunoneutralization of endogenous IL-6 in the spinal cord could alter STAT3 activation in SNL animals. Finally, we assessed the capability of the intrathecally delivered JAK2 inhibitor AG490 to block SNL-induced activation of STAT3 in the dorsal spinal cord and the repercussions of such blockade on pain behavior.

Material and methods

Animals

Animals used in this study (adult male Sprague–Dawley rats, 250–350 g; Centre d'Élevage Janvier, Le Genest-St Isle, France) were maintained under controlled conditions ($22 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ relative humidity, 12/12 h light/dark cycle, food and water *ad libitum*). All experiments were performed in conformity with the institutional guidelines that are in compliance with national and international law and policies for use of animals in neurosciences research (European Communities Council Directive No. 87848, October 1987, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale; Permission No. 6186 to MP).

Spinal nerve ligation

Left side L5 and L6 spinal nerves were injured as described by Kim and Chung (1992). Anesthesia was induced with 3% halothane in O₂

at 3 L/min and maintained with 1.5% halothane in O₂. A midline incision was made at the L3–S2 level and the dorsal vertebral column from L4 to S2 was exposed. Part of the L6 transverse process was carefully removed with fine rongeurs. The L5–L6 spinal nerves were isolated and tightly ligated distal to the DRG with a 4-0 silk suture. The wound was closed in two layers using absorbable sutures. A similar procedure was performed for the sham surgery, except that spinal nerves were not isolated and not ligated. After surgery, the sham-operated and SNL rats were housed individually and their posture was closely monitored before they were used in different experiments.

Immunohistochemistry

Animals were deeply anesthetized with pentobarbital and perfused transcardially with 100 mL of 0.9% NaCl supplemented with 0.1% sodium nitrite, followed by 800 mL of 4% *p*-formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer at 25°C. Lumbar spinal cords were dissected out and cryoprotected in 10% sucrose (24 h, 4°C). Twenty micrometers cryostat sections were pre-incubated (1 h, 25°C) in a 1x phosphate-buffered saline (PBS) buffer containing 3% donkey serum (Interchim, Montluçon, France) and 0.3% Triton X-100. Primary antibodies used for this study were rabbit anti-pSTAT3 (Tyr705, 1 : 200; Cell Signaling Technology, Ozyme, France), mouse anti-GFAP (1 : 5000; Chemicon International, Temecula, CA, USA), mouse anti-CD11b (1 : 120; Serotec, Oxford, UK), mouse Iba1 (1 : 50; Santa Cruz Biotechnology, Tebu, France), and mouse anti-microtubule-associated protein 2 (MAP2) (1 : 500; Chemicon International). Sections were incubated in the same buffer supplemented with primary antibodies overnight at 4°C. Secondary antibodies used were Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit Ig or Alexa 568-conjugated goat anti-mouse Ig (1 : 400; Interchim). After being washed (3 × 10 min, PBS 1x), sections were incubated for 1 h at 25°C with secondary antibodies, rinsed in PBS, and mounted in Fluoromount-G solution (Clinisciences, Montrouge, France). Slides were observed and images were generated using a Leica SP2 AOBS confocal microscope and LCS Leica software (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France).

Western blotting

Rats were killed by decapitation and the lumbar part of the spinal cord was removed in the cold (0–4°C). The lumbar enlargement (L5–L6) was divided into left (lesioned side) and right parts by sagittal cut, and then into their dorsal and ventral zones by a horizontal cut passing through the ependymal canal. Left (lesioned side) dorsal quadrants of the spinal cord were frozen immediately in liquid nitrogen and then stored at –80°C until they were used. Frozen tissue pieces were placed in ice-chilled Dounce homogenizer (Wheaton, VWR, Strasbourg, France), homogenized on ice in 170 µL of radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer [20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40 (VWR), 0.5% Na deoxycholate, 1 mM EDTA, and 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)] supplemented with proteases and phosphatases inhibitor cocktails (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Samples were centrifuged (10 000 g, 10 min, 4°C) and supernatants were centrifuged one more time. Subsequently, equal concentrations of proteins (100 µg), as determined by Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Paris, France) were mixed with standard Laemmli buffer, sonicated, heated at 95°C for 1 min, then separated by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis gel (10% acrylamide), and

electrotransferred (Trans-Blot SD; Bio-Rad) onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad). Membranes were first saturated in blocking solution (5% non-fat dry milk and 0.1% Tween 20 in PBS 1x) for 1 h at 25°C, and then incubated (overnight, 4°C) with rabbit anti-pSTAT3 (1 : 500; Cell Signaling Technology) in the blocking solution. After rinsing with PBS-T (PBS 1x, 0.1% Tween 20), blots were incubated (40 min, at 25°C) with horseradish peroxidase-linked anti-rabbit Ig (1 : 5000; Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) in the blocking solution. Blots were finally washed in PBS-T, then in PBS. Membranes were processed with ECL Plus kit (GE Healthcare Life Sciences, Orsay, France) and exposed to MP-ECL film (GE Healthcare Life Sciences). After washing in PBS-T, membrane was stripped in Tris-HCl 32.5 mM, pH 6.7, 2% SDS, and 100 mM β -mercaptoethanol before incubation with rabbit anti-STAT3 antibody (1 : 750; Cell Signaling Technology) and with mouse anti- α -tubulin (1 : 10 000; Amersham Biosciences). Relative intensities of the pSTAT3 and STAT3 immunoreactivity compared with the α -tubulin control were evaluated on scanned images of the blots.

Real-time RT-PCR analysis

Injured side (left) dorsal quadrant of the rat lumbar spinal cord was dissected out as described for western blotting experiments. Total RNA were extracted from frozen pieces of tissues using NucleoSpin® RNA II Purification Kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) and their quality and concentrations were evaluated by optical density using NanoDrop (Thermo Scientific, Labtech France, Palaiseau, France). First-strand cDNA synthesis (0.5 μ g total RNA per 20 μ L reaction) was carried out with Superscript III reverse-transcriptase and random primers (ribosomal phospho-protein at 0.25 μ g per reaction) (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Real-time PCR amplification of each sample in triplicate was performed on the ABI Prism 7300 apparatus (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) using ABgene Absolute QPCR ROX Mix (ABgene, Courtaboeuf, France) and the Assay-on-Demand Gene TaqMan PCR probes (Applied Biosystems) were used for target genes: SOCS3 (Rn00585674_s1), Integrin alpha M (ITGAM) (Rn00709342_m1), IL-6 (Rn00561420_m1), leukemia inhibitory factor (LIF) (Rn00573491_g1), ciliary neurotrophic factor (CNTF) (Rn00755092_m1), IL-1 β (Rn00580432_m1), tumor necrosis factor- α (Rn99999017_m1), COX-2 (Rn00568225_m1), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Rn9999916_s1). To perform semi-quantitative studies, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was used as reporter gene.

Interleukin-6 protein estimation by ELISA

Left part (lesioned) of dorsal spinal cord was dissected out and stored at -80°C. Frozen tissue pieces were homogenized in 200 μ L of 10 mM Tris pH 7.4, containing 50 mM NaCl, 2.5 mM MgCl₂, and the protease inhibitor cocktail 2 (Sigma-Aldrich). Samples were centrifuged at 20 000 g for 30 min at 4°C. Supernatants were aliquoted and stored at -80°C before protein quantification. IL-6 protein concentrations were determined using ELISA specific for IL-6 (R&D Systems, Lille, France) according to the manufacturer's instructions. Total protein concentrations were determined by the Bradford assay and used to adjust results for sample size.

Intrathecal injections of goat anti-rat IL-6 IgG or normal goat IgG

Under a halothane anesthesia, rats were injected intrathecally as described in Mestre *et al.* 1994. Briefly, a 25-gauge needle

connected to a Hamilton syringe was inserted between the spinous L5/L6 processes to the subarachnoid space, until a tail flick was elicited. Goat anti-rat IL-6 neutralizing antibody and normal goat IgG (R&D Systems) were diluted in artificial CSF (ACSF; Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) and administered at a concentration of 0.05 μ g/rat in a volume of 25 μ L. Rats, divided into three groups, were injected with 25 μ L of ACSF ($n = 4$), anti-rat IL-6 IgG ($n = 5$), or normal goat IgG ($n = 5$). Animals were injected 1 h before SNL surgery, then once per day during the next 2 days. The last injection was made 4 h before the animals were killed and the tissue samples dissected out. Tissues were then processed and western blots were performed as described above.

Intrathecal injection of AG490

Under a halothane anesthesia, rats were injected intrathecally with 1 or 5 μ g of JAK2 inhibitor tyrphostin AG490 (Euromedex, Souffelweysheim, France) in a volume of 25 μ L of 3.5% dimethylsulfoxide in ACSF. Sham animals were injected with the same volume of 3.5% dimethylsulfoxide in ACSF. Injections were made 24 and 1 h before the surgery, then once per day during the next 2 days; the last injection was achieved 4 h before animals were killed. The efficacy of AG490 to inhibit the accumulation of p-STAT3 was evaluated by western blot experiments in SNL rats treated with 1 μ g AG490.

Behavioral experiments

After arrival in the laboratory, animals were left to become accustomed to the animal care unit for 2 days. Behavioral analyses were realized in a completely blind manner. To avoid stress resulting from experimental conditions, all manipulations were performed in quiet conditions in a test room by the same experimenter. During 7 days before the experiments, animals were daily weighed, placed in the test room for 1 h (from 12 AM to 1 PM), and then gently handled during 5 min and left to become accustomed to various behavioral devices. Mechanical allodynia and hyperalgesia were evaluated on the day before the scheduled experiment day (D_{-1}) then, once again, on the experimental day (D_0) just before surgery. During the experiment, rats presented normal gain weight.

Mechanical allodynia

Mechanical allodynia was determined as described by Chaplan *et al.* (1994). Animals were acclimated in suspended cages with wire mesh buttons. The ipsilateral and contralateral hindpaws were probed with calibrated von Frey filaments (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) applied perpendicularly to the plantar surface and held for approximately 5 s. A positive response was indicated by a sharp withdrawal of the paw. The 50% paw-withdrawal threshold was determined by the non-parametric method of Dixon (1980), in which the stimulus was incrementally increased until a positive response was obtained, and then decreased until a negative result was observed. The protocol was repeated until three changes in behavior were determined and the pattern of positive and negative responses was tabulated. The 50% paw-withdrawal threshold was determined as $[10^{(Xf + k\Delta)}]/10\ 000$, where Xf = the value of the last von Frey filament employed, k = Dixon value for the positive/negative pattern, and Δ = the logarithmic difference between stimuli.

Thermal hyperalgesia

Thermal hyperalgesia was determined using the method of Hargreaves *et al.* (1988), assessing paw-withdrawal latency (PWL) to a thermal nociceptive stimulus. Rats were placed individually in a Plexiglas enclosure on top of a glass surface of thermal testing apparatus (Ugo Basile, Comerio, Italy) and allowed to acclimate 10 min before testing. A mobile radiant heat source (a high-intensity light beam) located under the glass, was focused on the mid-plantar surface of the hindpaw. The heat source and an electronic timer were activated automatically when the test started and switched off when a paw withdrawal was elicited. For each session, rats were tested individually first for the ipsilateral hindpaw and then for the contralateral one with a 5 min interval. Stimulus intensity was adjusted to give approximately 10 s withdrawal latency in normal rat and was kept constant throughout the entire experiment. A maximal cut-off of 18 s was used to prevent tissue damage. For each rat the Δ PWL was calculated as followed: Δ PWL = tested PWL – baseline PWL.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM. Data from RT-PCR, western blots, and behavioral experiments were validated using one-way ANOVA followed by Dunnett test. Statistical evaluation was performed with STATVIEW 5.0 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). When $p > 0.05$, the corresponding difference was considered to be non-significant.

Results

Peripheral nerve injury leads to p-STAT3 accumulation in rat dorsal spinal cord

Signal transducer and activator of transcription 3 activation was assessed using the phospho-STAT3 (Tyr705) specific antibody. Preliminary immunohistochemistry experiments showed that in SNL rats, p-STAT3 immunoreactive material (p-STAT3-IR) could be detected in the dorsal spinal cord ipsilaterally to the lesioned spinal nerves. The time course of peripheral nerve injury-evoked STAT3 activation in the ipsilateral dorsal horn of SNL rats was then assessed using western blot experiments. Phosphorylated-STAT3 levels did not significantly differ between naïve and sham-operated rats (24 h after sham surgery). When compared with sham animals, p-STAT3 levels in SNL animals were maximally increased at days 1 and 2 following nerve injury (3.1-fold, $p < 0.01$ and 2.8-fold, $p < 0.01$, respectively), remained elevated during the next 15 days and returned to control levels 3 weeks after nerve ligation (Fig. 1a). During the same period of time, the total levels of STAT3 protein in the dorsal horn of the spinal cord were not affected by peripheral nerve alteration (Fig. 1a).

The localization of p-STAT3 accumulation in the spinal cord was further analyzed with the same antibody in immunofluorescence experiments performed 48 h after nerve lesion.

Phosphorylated-STAT3-IR was neither detected in the spinal cord from sham-operated rats (Fig. 1b and c), nor in the side contralateral to the lesion in SNL rats (Fig. 1d). By

contrast, in the ipsilateral dorsal horn, SNL resulted in the accumulation of p-STAT3-IR mainly in the superficial and medial laminae (I–V) (Fig. 1e). In some SNL animals, p-STAT3 labeling was also observed spreading in part to the ventral horn. Interestingly, the rostro-caudal distribution of p-STAT3-IR in the lumbar enlargement appeared to be confined to the projection sites of afferents from injured nerves. Indeed, after SNL surgery, p-STAT3-IR containing cells were restricted only to the L5/L6 segments of the spinal cord (not shown).

To identify the cell type(s) that displayed p-STAT3-IR, double labeling immunofluorescence experiments were performed using microglial cell markers ITGAM (also known as OX-42) and Iba1 antibodies, and GFAP or MAP2 antibodies that are markers of astrocytes or neurons, respectively. As shown in Fig. 1f–i, microglial cells were activated following nerve injury in the ipsilateral spinal cord and frequently contained p-STAT3-IR. In contrast, neither astrocytes (Fig. 1j) nor neurons (Fig. 1k) in spinal cord of SNL animals were co-labeled for p-STAT3-IR.

SNL injury induced expression of the STAT3 target genes SOCS3 and COX-2 in the lesioned-side dorsal spinal cord

Real-time semi-quantitative RT-PCR was used to determine the levels of relevant mRNA in the dorsal spinal cord ipsilateral to the lesion. Samples from sham SNL animals presented no changes of mRNA levels when compared with naïve rats at any post-surgery time tested (data not shown). Sham values at each post-operative time were thus pooled and referred to as sham in the following data.

Concentration of SOCS3 mRNA that (as a target gene of STAT3 transcription factor) may represent an index of JAK/STAT3 activity, was markedly increased after SNL in the dorsal spinal cord ipsilaterally to the lesion [ANOVA for time; $F_{(1,18)} = 11.916$, $p < 0.0001$]. SOCS3 mRNA levels rapidly rose, reaching a maximum 24 h after injury (D_1 : mean 7.1 ± 1.9 , $p < 0.001$ and D_2 : mean 5.7 ± 0.2 , $p < 0.001$; Fig. 2). One week post-SNL injury, SOCS3 mRNA levels returned to the basal levels determined in sham rats. No significant difference in SOCS3 mRNA expression levels were observed in the contralateral side of the dorsal spinal cord of SNL rats versus sham controls (data not shown).

Expression of COX-2, another target gene of STAT3, was also up-regulated in the ipsilateral dorsal spinal cord after SNL (ANOVA for Time; $F_{(1,17)} = 8.668$, $p = 0.0002$). COX-2 mRNA levels increased as early as 6 h after injury (mean 2.6 ± 0.5 , $p < 0.05$), peaked 24 h after SNL (D_1 : mean 3.1 ± 0.4 , $p < 0.001$ and D_2 : mean 2.5 ± 0.4 ; $p < 0.05$) then returned to basal levels 1 week following SNL.

Finally, SNL injury induced an increase in mRNA levels of the microglial marker ITGAM, consistent with the above immunochemical data and further documenting the activation of microglial cells after SNL. ITGAM mRNA levels were

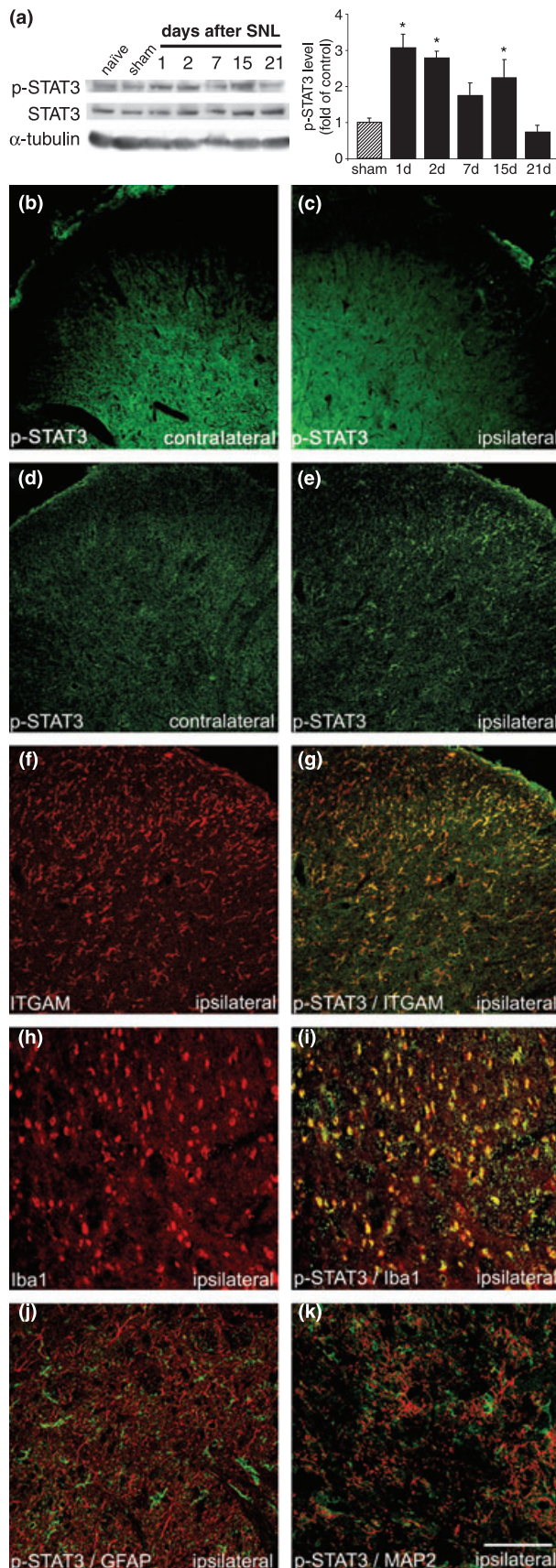


Fig. 1 STAT3 is phosphorylated in the rat dorsal spinal cord in response to SNL. STAT3 phosphorylation in ipsilateral dorsal spinal cord of naïve, sham operated (1 day after sham surgery) or SNL (1–21 days after surgery) rats was evaluated in western blot experiments with antibodies specific of the phosphorylated (at Tyr705) form of STAT3 (p-STAT3) and anti-STAT3 (STAT3) antibodies. For each time point, equal amounts of total proteins (100 μ g) were loaded on 10% SDS–polyacrylamide gel electrophoresis as described in Materials and methods. Blots are representative of three independent experiments performed with distinct set of animals from each experimental group ($n = 3$ per time point). Loading controls were provided by immunoblotting α -tubulin protein. SNL induces a rapid and persistent STAT3 activation as shown in the right panel (a); results for p-STAT3 levels are presented in relation to the individual α -tubulin loading control and normalized to sham controls within the same blot (left panel a); * $p < 0.01$ versus control (ANOVA followed by the Dunnett test). Forty-eight hours after SNL injury, rats were killed and their spinal cords were processed for immunohistochemistry experiments (b–k). Tissue slices (20 μ m) were stained with anti-p-STAT3 antibodies (in green). Sham surgery induced no p-STAT3-IR staining in dorsal spinal cord contralateral (b) or ipsilateral (c) to the surgery. After SNL, no p-STAT3-IR could be detected in the contralateral to the lesion dorsal spinal cord (d) whereas in ipsilateral side, numerous cells are endowed with p-STAT3-IR (e). ITGAM-IR (f) as well as Iba1-IR (h) (microglial markers, in red) reveal strong microglial activation in the ipsilateral dorsal spinal cord of SNL rats. Double labeling experiments performed with p-STAT3 and ITGAM (g) or p-STAT3 and Iba1 (i) specific antibodies reveal that p-STAT3-IR is mostly accumulating in spinal cord microglial cells. On the other hand, neither astrocytes (stained with anti-GFAP antibodies, j) nor neurons (anti-MAP2 antibodies, k) are co-labeled for p-STAT3-IR. Scale bar (b–g), 100 μ m and (h–k), 50 μ m.

significantly enhanced from day 1 after SNL injury, peaked after 2 days (D_2 : mean 3.5 ± 0.2 , $p < 0.001$) then remained significantly elevated until 21 days after SNL [D_{21} : mean 1.8 ± 0.2 , $p < 0.01$; ANOVA for time; $F_{(1,17)} = 21.176$, $p < 0.001$].

IL-6 plays a major role in the activation of the spinal JAK/STAT3 pathway after SNL

To assess the role of IL-6 in the activation of the JAK/STAT3 pathway, we first analyzed the expression of IL-6 mRNA in the ipsilateral dorsal spinal cord and DRG of SNL rats [ANOVA for time; $F_{(1,17)} = 4.838$, $p = 0.0037$]. As shown in Fig. 3a, dorsal horn tissue from SNL rats presented moderately increased levels of IL-6 mRNA only at 7 days (D_7 : mean 2.1 ± 1.0 , $p < 0.05$) and 15 days (D_{15} : mean 1.8 ± 0.3 , $p < 0.05$) after surgery when compared with sham-operated rats. In contrast, in L5–L6 DRG, nerve injury led to a massive induction of IL-6 mRNA expression. IL-6 mRNA levels were increased as soon as 6 h after the surgery (mean 302.2 ± 121.8 ; $p < 0.05$) and remained significantly elevated until 7 days post-SNL (D_1 : mean 253.5 ± 52.7 , $p < 0.05$; D_2 : mean 219.1 ± 20.8 , $p < 0.05$; and D_7 : mean 138.7 ± 13.4 , $p < 0.05$) (Fig. 3b).

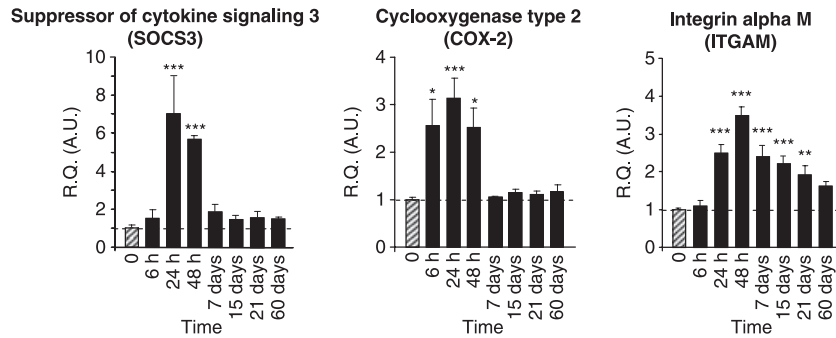


Fig. 2 Expression profile of JAK/STAT3 transduction pathway target genes SOCS3 and COX-2, and microglia activation marker ITGAM in the ipsilateral dorsal spinal cord after SNL surgery. For each time point studied relative quantification (R.Q.) expressed in arbitrary unit (A.U.) corresponds to the ratio of specific mRNA over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA. In each graph, the dotted line

represents the R.Q. of respective mRNA determined in sham animals (0). No significant difference has been observed between sham-operated and non-operated animals (data not shown). Each bar is the mean \pm SEM of three to four animals per experimental group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ versus controls; ANOVA followed by the Dunnett test.

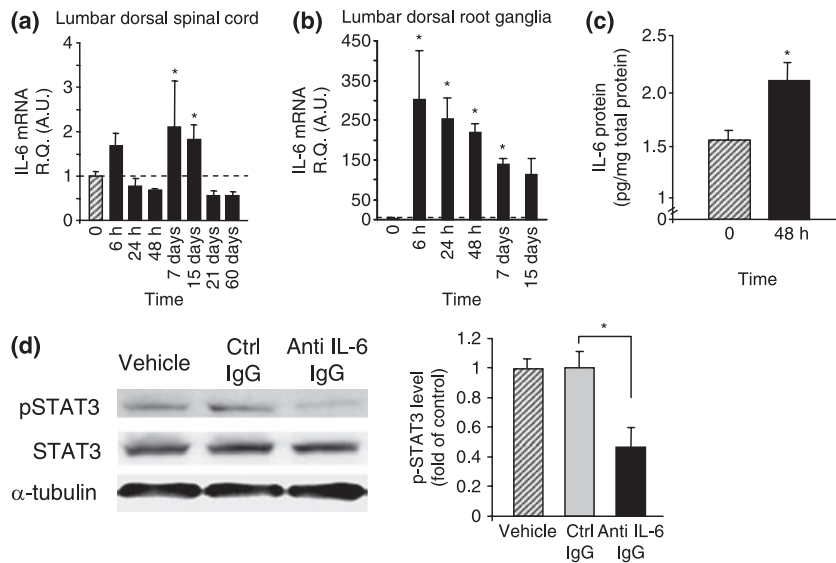


Fig. 3 Overproduced IL-6 is involved in p-STAT3 accumulation in the rat dorsal spinal after SNL. After SNL, IL-6 mRNA expression is moderately increased in the ipsilateral dorsal spinal cord (a) and massively in L5–L6 DRG (b). For each time point studied, mRNA concentrations are expressed as ratios of their quantity versus control sham operated rats (0). No significant difference has been observed between sham-operated and non-operated animals (data not shown). When compared with sham animals (0), IL-6 protein levels are significantly increased (+40%) in the lumbar dorsal spinal cord 48 h after SNL (c). Data are expressed as mean \pm SEM versus

controls; ANOVA followed by the Dunnett test ($n = 3-4$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$). After intrathecal injection of immunoneutralizing goat anti-rat IL-6 antibodies, normal goat antibodies or vehicle in SNL rats, presence of phosphorylated form of STAT3 was assessed using western blot experiments. Western blots and their quantification were performed as described in legend to Fig. 1. Note that p-STAT3-IR levels are strongly reduced (-56%) in SNL rats injected with anti-IL-6 antibodies. A representative blot of three independent experiments is shown ($n = 3$ for each experimental group).

We also analyzed the expression profile of LIF and CNTF, two structurally related cytokines that signal through the gp130 receptor. In the dorsal spinal cord, LIF mRNA levels increased approximately twofold at 24 h (mean 2.3 ± 0.5 , $p < 0.05$) and 48 h (mean 2.2 ± 0.6 , $p < 0.05$) after surgery. However, in sharp contrast to IL-6 mRNA levels, LIF mRNA concentrations only slightly increased 48 h (mean 1.6 ± 0.1 , $p < 0.01$) and 7 days (mean 1.8 ± 0.1 , $p < 0.01$) in the DRG

following SNL (data not shown). As regards CNTF, mRNA concentrations in the dorsal spinal cord and DRG of SNL rats were unchanged after nerve lesion and remained comparable to those determined in sham animals (data not shown).

To test whether IL-6 produced in the DRG could participate in activation of the JAK/STAT3 pathway at the spinal cord level, we measured the concentration of IL-6 in the ipsilateral dorsal spinal cord 48 h after SNL, i.e. at a time point when IL-6

mRNA expression was not yet induced locally in the spinal cord but when p-STAT3-IR was already present. As shown in Fig. 3c, IL-6 concentration was significantly enhanced (mean 1.4, $p < 0.05$) in the dorsal spinal cord of SNL animals when compared with sham rats.

To further evaluate a possible direct relationship between the enhanced levels of IL-6 and the phosphorylation of JAK/STAT3 in the dorsal spinal cord of SNL rats, we intrathecally administered an anti-rat IL-6 antibody to immunoneutralize the cytokine. When compared with p-STAT3-IR levels in the ipsilateral dorsal spinal cord of vehicle- or control goat IgG-injected SNL rats, western blot experiments revealed that injection of a specific goat anti-IL-6 IgG resulted in significantly decreased levels of the phosphorylated form of STAT3 ($-56%$, $p < 0.01$) (Fig. 3d).

JAK2 inhibitor AG490 blocks the peripheral nerve injury-associated p-STAT3-IR accumulation in the spinal cord and attenuates the development of neuropathic pain

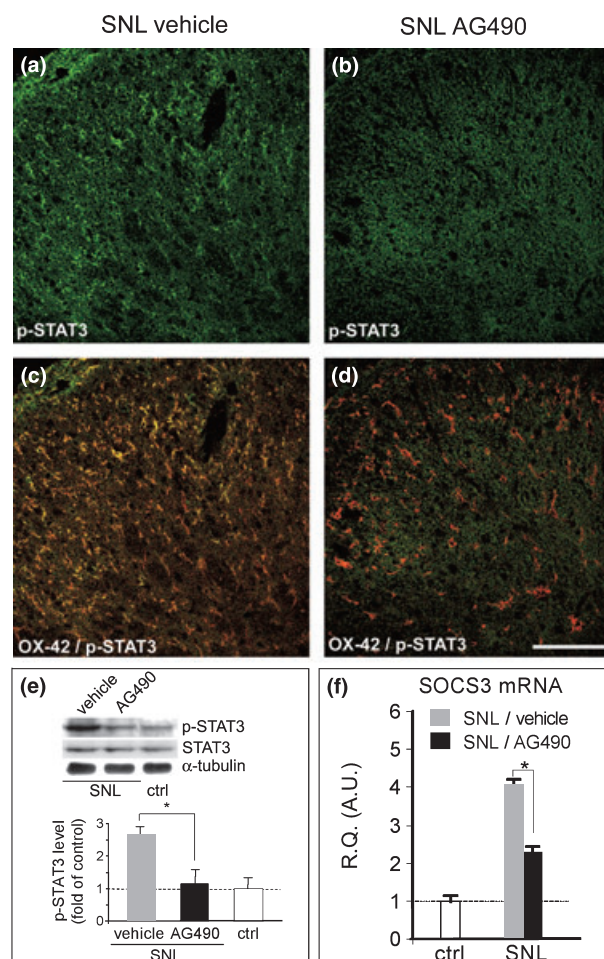
To assess the participation of the JAK/STAT3 pathway in the generation of mechanical and thermal hypersensitivity in SNL rats, we sought to block the activity of JAK2 that plays

a major role in STAT3 phosphorylation (activation), and we evaluated the consequences of this blockade on pain behavior. Vehicle or the JAK2 inhibitor AG490 (1 or 5 $\mu\text{g}/\text{rat}$) were intrathecally administered in rats before SNL surgery and during the next 2 post-operative days. STAT3 activation in the spinal cord of vehicle- or AG490-treated SNL rats was evaluated through the measurement of accumulation of p-STAT3-IR [immunohistochemistry (IHC) and western blot] and of SOCS3 mRNA (RT-PCR) 2 days after SNL.

In the spinal cord of AG490-treated (1 $\mu\text{g}/\text{rat}$) SNL rats, p-STAT3 labeling was strongly reduced and frequently undetectable (Fig. 4a and b). Double labeling experiments showed that whereas AG490 treatment had globally no effect on ITGAM labeling, it almost completely abolished p-STAT3 staining in activated microglial cells from SNL rats (Fig. 4c and d).

Western blot experiments confirmed that intrathecal injection of AG490 (1 $\mu\text{g}/\text{rat}$) markedly inhibited, almost back to control levels, the accumulation of p-STAT3 in the dorsal spinal cord of SNL rats ($-90%$, $p < 0.01$, Fig. 4e). Furthermore, the induction of SOCS3 mRNA observed in the dorsal

Fig. 4 Inhibition of p-STAT3-IR accumulation in dorsal spinal cord of SNL rats after intrathecal injection of the JAK2 inhibitor AG490. One micrograms of JAK2 inhibitor tyrphostin AG490 in 25 μL of 3.5% dimethylsulfoxide in ACSF was administered 24 and 1 h before the surgery, then once per day during the 2 next days. SNL sham-treated animals were injected with the same volume of 3.5% dimethylsulfoxide in ACSF. Forty-eight hours after SNL, spinal cords of vehicle- (left panels a and c) or AG490-injected rats (right panels b and d) were immunostained with p-STAT3 (in green a and b) or double labeled with p-STAT3 and ITGAM (in red) antibodies (c and d). Note the absence of p-STAT3 labeling in the dorsal spinal cord of SNL AG490-treated rats (b) and in ITGAM labeled microglial cells (d). Scale bar, 100 μm . Accumulation of p-STAT3-IR in ipsilateral dorsal spinal cord of control naïve rats and SNL sham- or AG490-treated rats was evaluated in western blot experiments performed as described in legend to Fig. 1e. Immunoblots reveal that p-STAT3-IR levels in SNL rats treated with JAK2 inhibitor AG490 are strongly reduced ($-90%$) when compared with vehicle-injected rats and are comparable to the resting p-STAT3-IR levels measured in naïve rats. A representative blot of three independent experiments is shown ($n = 3$ for each experimental group). Each bar is the mean \pm SEM, $*p < 0.01$ versus SNL rats injected with the vehicle; ANOVA followed by the Dunnett test. Furthermore, the potency of AG490 to inhibit JAK2/STAT3 signaling system was evaluated by quantifying the expression of SOCS3, a target gene of STAT3 transcription factor, in ipsilateral dorsal spinal cord of sham- or AG490-treated SNL rats 2 days after the surgery i.e. the day of the last AG490 administration (f). SOCS3 mRNA levels are represented as R.Q. corresponding to the ratio of SOCS3 mRNA over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA. The open bar and the dotted line represent the R.Q. of SOCS3 mRNA determined in control naïve animals. Each bar is the mean \pm SEM of independent determinations in three to four animals per group. $*p < 0.01$ versus controls; ANOVA followed by the Dunnett test.



spinal cord 2 days after SNL was also significantly reduced following the treatment of rats with AG490 (-53.3% , $p < 0.01$, Fig. 4f).

Behavioral experiments were performed at the first and second post-operative days (the days of animals injection with vehicle or AG490), then at distance, 7 days after the surgery (i.e. 5 days after the end of AG490 administration). Sham-operated rats displayed comparable pain sensitivity (mechanical or thermal stimulations) to that measured in naïve rats. By contrast, SNL injury resulted in a rapid development of mechanical allodynia and thermal hyperalgesia that were established from the first post-injury day (Fig. 5). Mechanical and thermal pain sensitivity of naïve or sham operated rats injected with AG490 (1 or 5 $\mu\text{g}/\text{rat}$), as assessed by the von Frey filaments or Hargreaves test, was undistinguishable from that determined in naïve untreated rats. Pain thresholds in vehicle-treated SNL rats were not significantly different from those of control SNL non-injected rats (data not shown). On the contrary, when compared with sham-injected SNL rats, SNL animals injected with AG490 at the dose of 1 $\mu\text{g}/\text{rat}$ presented significantly attenuated hindpaws mechanical allodynia, both ipsilaterally (D_2 : $p < 0.01$) and contralaterally to the lesion (D_1 : $p < 0.01$ and D_2 : $p < 0.001$) (Fig. 5a). Moreover, 5 days after the end of the treatment (D_7 in Fig. 5a), AG490-injected SNL rats still displayed reduced mechanical allodynia in the ipsilateral ($p < 0.01$) and contralateral paws ($p < 0.05$). Thermal hyperalgesia was also reduced in the ipsilateral paw (D_1 : $p < 0.01$ and D_2 : $p < 0.05$) of SNL rats administered with AG490 when compared with that in paired vehicle-treated rats in the ipsilateral paw. However, AG490 treatment was no longer effective 5 days latter and had no effect on thermal hypersensitivity of the contralateral paw in SNL rats at any time studied (Fig. 5b). Treatment of rats with a higher dose of AG490 (5 $\mu\text{g}/\text{rat}$) did not produce a significantly greater antiallodynic or antihyperalgesic effect than AG490 at 1 $\mu\text{g}/\text{rat}$ (SNL sham-injected rats $n = 6$, SNL 5 $\mu\text{g}/\text{rat}$ AG490-injected rats $n = 6$; $p > 0.05$ ANOVA followed by the Dunnett test; data not shown).

Discussion

Injury of peripheral nerves leads to an enhanced production of proinflammatory cytokines that participate in the alteration of spinal systems involved in pain processing and might therefore contribute to the development of chronic neuropathic pain situations. Although conflicting results have been reported concerning IL-6 effects on pain (DeLeo *et al.* 1996; Arruda *et al.* 2000; but see Flatters *et al.* 2003; for reviews see De Jongh *et al.* 2003; Bauer *et al.* 2007), recent data suggest that in the rat spinal cord this cytokine might play an important role in pain facilitation brought about by intrathecal administration of gp-120, an envelope glycoprotein of HIV-1 (Schoeniger-Skinner *et al.* 2007). Here, using a well-

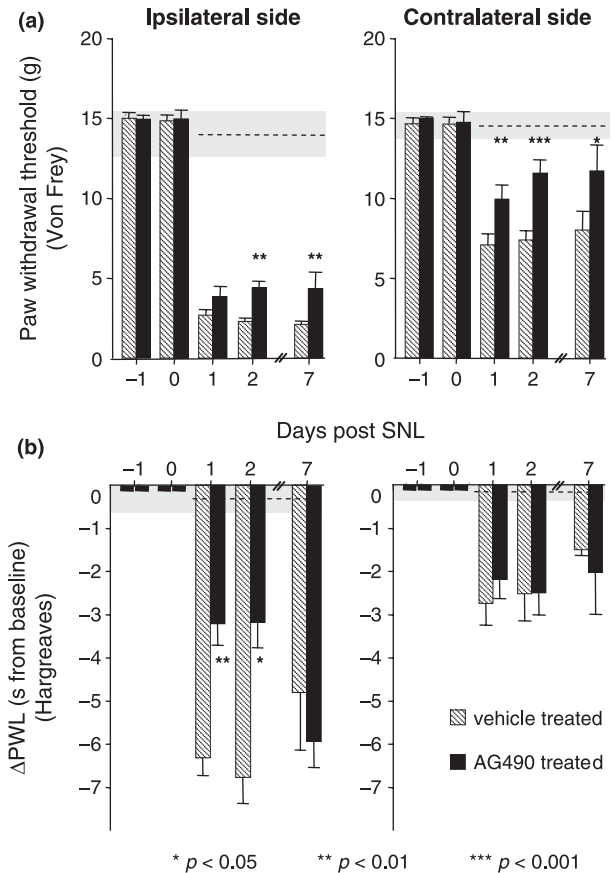


Fig. 5 Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in rats intrathecally injected with the JAK2 inhibitor AG490. JAK2 inhibitor tyrophostin AG490 (1 $\mu\text{g}/\text{rat}$) or vehicle were intrathecally administered as described in legend to Fig. 4. Sensitivity to mechanical stimulation was evaluated using Von Frey filaments (a). Paw withdrawal latency (PWL) to a thermal stimulus was assessed using the Hargreaves test. For each rat the ΔPWL was calculated as followed: $\Delta\text{PWL} = \text{tested PWL} - \text{baseline PWL}$ (b). The gray field with dotted line in each panel represents values (mean \pm SEM, $n = 6$) for paw withdrawal threshold or ΔPWL determined in sham-operated rats that were not significantly different from naïve rats. Administration of AG490 in sham-operated animals induced no modification of their mechanical or thermal sensitivity that remained comparable to baseline values all along the experiment. D_1 and D_2 : AG490 group $n = 11$, vehicle group $n = 10$, D_7 : AG490 group $n = 5$, vehicle group $n = 4$. Each bar is the mean \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus vehicle-injected controls, ANOVA followed by the Dunnett test.

characterized model of neuropathic pain evoked by SNL, we show that nerve injury leads to the activation of the major IL-6 signaling pathway, JAK/STAT3, in the dorsal part of the spinal cord. Accumulation of active STAT3 (phosphorylated form) occurs in activated microglial cells and coincides with an early and massive induction of IL-6 mRNA expression in the DRG and an increase in IL-6 concentrations in the dorsal spinal cord. Immunoneutralization of IL-6 in the dorsal spinal cord leads to a marked reduction of STAT3

phosphorylation. Finally, intrathecal administration of the JAK2 tyrosine kinase inhibitor AG490 suppresses STAT3 activation, markedly reduces SOCS3 mRNA induction taken as an index of STAT3 activity and attenuates ipsilateral mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in SNL animals.

Activation of the JAK/STAT3 pathway in response to nerve axotomy has been previously examined in motor neurons (Schwaiger *et al.* 2000; Schweizer *et al.* 2002) and in sensory motor sciatic nerve (Lee *et al.* 2004; Qiu *et al.* 2005). In both nerve systems, STAT3 plays an important signaling role in nerve survival and regeneration. Interestingly, in a model of transected then reconnected sciatic nerve, p-STAT3 axonal labeling was absent in dorsal roots and in dorsal spinal cord suggesting an absence of retrograde signaling of activated STAT3 from cell bodies to the central projections of sensory neurons (Lee *et al.* 2004). These data fit with our observations that SNL did not result in p-STAT3 staining in dorsal roots or their entry zone in the dorsal spinal cord. They also support the idea that accumulation of p-STAT3-IR in the dorsal spinal cord, observed in our study after SNL, represents locally activated STAT3 in intrinsic spinal cord cellular elements. Using double labeling IHC experiments, we confirmed this observation showing that spinal cord cells endowed with p-STAT3-IR were almost exclusively co-labeled for microglia/macrophage markers ITGAM or Iba1. Despite this close colocalization, microglial activation was apparently independent of STAT3 activation. Indeed, although inhibition of STAT3 activity with intrathecal AG490 clearly decreased expression of the STAT3 target gene *socs3*, the levels of mRNA encoding the marker of activated microglia (ITGAM) were unaffected by this treatment (data not shown). These results thus suggest that the JAK/STAT3 pathway plays a minor role in microglial activation after peripheral nerve lesion. Activated STAT3 was observed neither in astrocytes (GFAP) nor in neurons (MAP2). This staining pattern was observed 48 h after peripheral nerve alteration (apparent highest p-STAT3-IR levels) and 1 week after injury, although at this time point the labeling was generally faint (not shown). Contrary to our observations, it was reported after traumatic spinal cord injury, which represents however a distinct experimental model from ours, that the JAK/STAT3 pathway at the spinal level may be activated in various cell types depending on post-injury period (Yamauchi *et al.* 2006). Furthermore, it was shown in the brain that IL-6, which is constitutively expressed by astrocytes, triggers the phosphorylation of STAT3 mainly in microglia and endothelial cells but also, at lower levels, in astrocytes (Sanz *et al.* 2008). Because at the later post-surgery time points in our SNL model, p-STAT3 labeling was near or below the detection limit of IHC, we cannot exclude a delayed activation of the JAK/STAT3 pathway in different cell type(s) of the dorsal spinal cord.

Spinal nerve ligation resulted in accumulation of p-STAT3-IR only in L5/L6 segments of the dorsal spinal

cord that correspond to the zone of central projections of respective injured nerves, thus suggesting that the STAT3 pathway might be activated by signals from terminals of central afferents. This possibility is further supported by our data showing that after a complete section of the sciatic nerve, p-STAT3-IR accumulated in the dorsal spinal cord through almost all the lumbar enlargement (unpublished observations). Numerous neurotransmitters, neuromodulators, and signaling molecules are released from primary afferents after sensory nerve alteration. Several of them, such as ATP, chemokines ligand 2 (CCL2), and fractalkine have been already identified as playing an important role in recruitment and activation of spinal cord microglial cells (for reviews see Watkins and Maier 2003; Scholz and Woolf 2007). Among cytokines, the IL-6 family of neuropoietic molecules (including LIF, CNTF, etc.) represents prominent activators of the JAK/STAT3 pathway. As already reported and further confirmed in our study, a variety of peripheral nerve injuries increased IL-6 production in DRG (Murphy *et al.* 1995; Lee *et al.* 2004). Using *in situ* hybridization it has been shown that sciatic nerve injury resulted in IL-6 mRNA accumulation in nerve cell bodies in DRG (Murphy *et al.* 1995). Although these authors suggested that IL-6 might act on spinal cord glia or neurons, to our knowledge IL-6 release from primary sensory nerves has not been reported. We measured the concentration of IL-6 in the dorsal part of the ipsilateral spinal cord 48 h after SNL, i.e. at a time point when expression of IL-6 mRNA was already massively enhanced in DRG but not yet in the spinal cord, and showed that IL-6 levels were significantly increased (+40%). When specific anti-IL-6 antibodies were intrathecally administered in rats to immunoneutralize the cytokine, accumulation of p-STAT3-IR, observed in control rats 48 h after SNL, was almost completely inhibited. Collectively, these data support the idea that after nerve injury-induced massive production of IL-6 in DRG, the cytokine might be transported to central terminals of primary afferents, released and stimulate its signal-transduction pathway JAK/STAT3 in the spinal cord microglial cells. Seven and 15 days after SNL, IL-6 mRNA expression was moderately induced also in the dorsal spinal cord and at these time points the locally produced IL-6 may participate in the activation of the JAK/STAT3 pathway. It is possible that other members of the IL-6 family of cytokines signaling through JAK/STAT3, such as CNTF and LIF, could have participated in the activation of this pathway. Analysis of mRNA expression profiles for these cytokines in the DRG and spinal cord revealed that CNTF mRNA expression was unaltered after SNL, making a participation of CNTF in JAK/STAT3 activation quite unlikely. A slight induction of LIF mRNA expression in the DRG of injured nerves and in the dorsal spinal cord was observed after SNL. It thus cannot be ruled out that LIF might contribute to STAT3 activation in the spinal cord of SNL rats.

To evaluate the contribution of the JAK/STAT3 pathway to the neuropathic pain state that develops following SNL in the rat, we sought to inhibit STAT3 activation by blocking JAK2, one of the major STAT3 activating kinase, with the JAK2 inhibitor AG490. Treatment of SNL rats with AG490 (1 µg/rat), known to block the STAT3 pathway both *in vitro* (Liu and Snider 2001) and *in vivo* (Qiu *et al.* 2005), resulted in a virtually total suppression of STAT3 phosphorylation and in a marked reduction of SOCS3 mRNA expression, a gene in which transcription is largely controlled by the JAK/STAT3 pathway. We then assessed the consequences in SNL rats of JAK/STAT3 blockade on mechanical allodynia and thermal hyperalgesia. Both responses were attenuated in SNL rats treated with AG490 (1 µg/kg). Treatment of animals with a higher dose of AG490 (5 µg/rat) did not produce a significantly greater antihyperalgesic and antiallodynic effect than the 1 µg/kg dose. This finding is consistent with data from western blot experiments showing that, at the dose of 1 µg/rat, intrathecal injection of AG490 almost completely blocked STAT3 activation.

As discussed above, our data show that endogenous IL-6 plays a major role in the activation of the JAK/STAT3 pathway in the dorsal spinal cord following nerve injury. This is in agreement with the overall pro-nociceptive action of IL-6 (Milligan *et al.* 2003; for reviews see De Jongh *et al.* 2003; Bauer *et al.* 2007). We mentioned the possibility that LIF might also participate in JAK/STAT3 activation in the spinal cord of SNL rats. However, unlike IL-6, LIF has an ambiguous role in nociception. Thus, in contrast to its proinflammatory action in the nervous system [activation of astrocytes and microglia; chemotactic activity (Sugiura *et al.* 2000; Tofaris *et al.* 2002)] that might promote pain development, LIF exerts also an anti-inflammatory effect and reduces the pain that develops after peripheral inflammation (Banner *et al.* 1998). Together with the low level of induction observed here for this cytokine in the DRG and spinal cord of SNL rats, this makes it unlikely that LIF could have had a major contribution to the development of pain hypersensitivity in our experimental model.

Interestingly, treatment with AG490 reduced not only ipsilateral mechanical allodynia and thermal hypersensitivity but also attenuated contralateral mechanical allodynia in SNL rats. This latter observation suggests that although we were unable to detect with immunohistochemical techniques the activation of STAT3 in the contralateral spinal cord, this pathway might nonetheless be activated at this level and participate in the development of mechanical allodynia. Indeed, as reported in another model of neuropathic pain (perisciatic administration of zymosan) IL-6, among other cytokines, participated in both ipsilateral and contralateral (mirror-image) mechanical allodynia (Milligan *et al.* 2003). On the other hand, blockade of STAT3 activation with AG490 had no effect on contralateral thermal hyperalgesia. This observation is in agreement with previous data

showing that IL-6 is not involved in mirror-image thermal hyperalgesia and that different systems underlie this phenomenon (Coderre and Melzack 1991; Malan *et al.* 2000). Interestingly, SNL-induced bilateral mechanical allodynia was still reduced 5 days after the end of AG490 treatment (i.e. 7 days after nerve injury) suggesting that initial activation of the JAK/STAT3 pathway may participate, in particular, in the development of mechanical hypersensitivity. The transiently enhanced STAT3 activity observed here after SNL supports the idea that this pathway is involved in the early phase of pain induction. Further studies are needed to assess whether inhibition of the JAK/STAT3 pathway may also play a role in the later stages of chronic neuropathic pain.

In conclusion, our results show that spinal nerve lesion leads to an early activation of the JAK2/STAT3 pathway in the spinal cord microglia in projections areas of injured nerves. Blockade of this signaling pathway, mainly activated by nerve injury-induced IL-6, attenuates the generation of ipsilateral mechanical and thermal hypersensitivity and the mirror-image mechanical allodynia evoked by SNL. We have previously shown the feasibility of attenuating chronic pain by blocking transduction pathways in the spinal cord glia through targeted viral vector-mediated transgene expression (Meunier *et al.* 2007). Targeting the JAK/STAT3 pathway using similar approaches might represent a means by which one could further (and more specifically) investigate the involvement of this pathway in chronic pain.

Acknowledgement

We are grateful to Drs A. Bogdan and P. Kitabgi, for critical reading of the manuscript and helpful discussions. This study is supported by grants from INSERM, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Institut UPSA de la Douleur and Institut pour la Recherche sur la Moelle épinière et l'Encéphale.

References

- Arruda J. L., Colburn R. W., Rickman A. J., Rutkowski M. D. and DeLeo J. A. (1998) Increase of interleukin-6 mRNA in the spinal cord following peripheral nerve injury in the rat: potential role of IL-6 in neuropathic pain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **62**, 228–235.
- Arruda J. L., Sweitzer S., Rutkowski M. D. and DeLeo J. A. (2000) Intrathecal anti-IL-6 antibody and IgG attenuates peripheral nerve injury-induced mechanical allodynia in the rat: possible immune modulation in neuropathic pain. *Brain Res.* **879**, 216–225.
- Banner L. R., Patterson P. H., Allchorne A., Poole S. and Woolf C. J. (1998) Leukemia inhibitory factor is an anti-inflammatory and analgesic cytokine. *J. Neurosci.* **18**, 5456–5462.
- Bauer S., Kerr B. J. and Patterson P. H. (2007) The neuropietic cytokine family in development, plasticity, disease and injury. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 221–232.
- Cafferty W. B., Gardiner N. J., Gavazzi I., Powell J., McMahon S. B., Heath J. K., Munson J., Cohen J. and Thompson S. W. (2001) Leukemia inhibitory factor determines the growth status of injured adult sensory neurons. *J. Neurosci.* **21**, 7161–7170.

- Cafferty W. B., Gardiner N. J., Das P., Qiu J., McMahon S. B. and Thompson S. W. (2004) Conditioning injury-induced spinal axon regeneration fails in interleukin-6 knock-out mice. *J. Neurosci.* **24**, 4432–4443.
- Chaplan S. R., Bach F. W., Pogrel J. W., Chung J. M. and Yaksh T. L. (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Methods* **53**, 55–63.
- Coderre T. J. and Melzack R. (1991) Central neural mediators of secondary hyperalgesia following heat injury in rats: neuropeptides and excitatory amino acids. *Neurosci. Lett.* **13**, 71–74.
- De Jongh R. F., Vissers K. C., Meert T. F., Boonij L. H., De Deyne C. S. and Heylen R. J. (2003) The role of interleukin-6 in nociception and pain. *Anesth. Analg.* **96**, 1096–1103.
- DeLeo J. A., Colburn R. W., Nichols M. and Malhotra A. (1996) Interleukin-6-mediated hyperalgesia/allodynia and increased spinal IL-6 expression in a rat mononeuropathy model. *J. Interferon Cytokine Res.* **16**, 695–700.
- Dixon W. J. (1980) Efficient analysis of experimental observations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **20**, 441–462.
- Ehret G. B., Reichenbach P., Schindler U., Horvath C. M., Fritz S., Nabholz M. and Bucher P. (2001) DNA binding specificity of different STAT proteins. Comparison of in vitro specificity with natural target sites. *J. Biol. Chem.* **276**, 6675–6688.
- Flatters S. J., Fox A. J. and Dickenson A. H. (2003) Spinal interleukin-6 (IL-6) inhibits nociceptive transmission following neuropathy. *Brain Res.* **984**, 54–62.
- Fujimoto M. and Naka T. (2003) Regulation of cytokine signaling by SOCS family molecules. *Trends Immunol.* **24**, 659–666.
- Hargreaves K., Dubner R., Brown F., Flores C. and Joris J. (1988) A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* **32**, 77–88.
- He B., You L., Uematsu K., Matsangou M., Xu Z., He M., McCormick F. and Jablons D. M. (2003) Cloning and characterization of a functional promoter of the human SOCS-3 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**, 386–391.
- Heinrich P. C., Behrmann I., Haan S., Hermanns H. M., Müller-Newen G. and Schaper F. (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* **374**, 1–20.
- Imada K. and Leonard W. J. (2000) The Jak-Stat pathway. *Mol. Immunol.* **37**, 1–11.
- Kim S. H. and Chung J. M. (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* **50**, 355–363.
- Lee N., Neitzel K. L., Devlin B. K. and MacLennan A. J. (2004) STAT3 phosphorylation in injured axons before sensory and motor neuron nuclei: potential role for STAT3 as a retrograde signaling transcription factor. *J. Comp. Neurol.* **474**, 535–545.
- Liu R. Y. and Snider W. D. (2001) Different signaling pathways mediate regenerative versus developmental sensory axon growth. *J. Neurosci.* **21**, 164.
- Malan T. P., Ossipov M. H., Gardell L. R., Ibrahim M., Bian D., Lai J. and Porreca F. (2000) Extraterritorial neuropathic pain correlates with multisegmental elevation of spinal dynorphin in nerve-injured rats. *Pain* **86**, 185–194.
- Mestre C., Pelissier T., Fialip J., Wilcox G. and Eschalier A. (1994) A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **32**, 197–200.
- Meunier A., Latrémoillère A., Dominguez E., Mauborgne A., Philippe S., Hamon M., Mallet J., Benoliel J. J. and Pohl M. (2007) Lentiviral-mediated targeted NF- κ B blockade in dorsal spinal cord glia attenuates sciatic nerve injury-induced neuropathic pain in the rat. *Mol. Ther* **15**, 687–697.
- Miao T., Wu D., Zhang Y., Bo X., Subang M. C., Wang P. and Richardson P. M. (2006) Suppressor of cytokine signaling-3 suppresses the ability of activated signal transducer and activator of transcription-3 to stimulate neurite growth in rat primary sensory neurons. *J. Neurosci.* **26**, 9512–9519.
- Milligan E. D., Twining C., Chacur M., Biedenkapp J., O'Connor K., Poole S., Tracey K., Martin D., Maier S. F. and Watkins L. R. (2003) Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *J. Neurosci.* **23**, 1026–1040.
- Murphy P. G., Grondin J., Altares M. and Richardson P. M. (1995) Induction of interleukin-6 in axotomized sensory neurons. *J. Neurosci.* **15**, 5130–5138.
- Qiu J., Cafferty W. B., McMahon S. B. and Thompson S. W. (2005) Conditioning injury-induced spinal axon regeneration requires signal transducer and activator of transcription 3 activation. *J. Neurosci.* **25**, 1645–1653.
- Sanz E., Hofer M. J., Unzeta M. and Campbell I. L. (2008) Minimal role for STAT1 in interleukin-6 signaling and actions in the murine brain. *Glia* **56**, 190–199.
- Schoeniger-Skinner D. K., Ledebuer A., Frank M. G., Milligan E. D., Poole S., Martin D., Maier S. F. and Watkins L. R. (2007) Interleukin-6 mediates low-threshold mechanical allodynia induced by intrathecal HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *Brain Behav. Immun.* **21**, 660–667.
- Scholz J. and Woolf C. J. (2007) The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat. Neurosci.* **10**, 1361–1368.
- Schwaiger F. W., Hager G., Schmitt A. B. *et al.* (2000) Peripheral but not central axotomy induces changes in Janus kinases (JAK) and signal transducers and activators of transcription (STAT). *Eur. J. Neurosci.* **12**, 1165–1176.
- Schweizer U., Gunnarsen J., Karch C., Wiese S., Holtmann B., Takeda K., Akira S. and Sendtner M. (2002) Conditional gene ablation of Stat3 reveals differential signaling requirements for survival of motoneurons during development and after nerve injury in the adult. *J. Cell Biol.* **156**, 287–297.
- Sheu J. Y., Kulhanek D. J. and Eckenstein F. P. (2000) Differential patterns of ERK and STAT3 phosphorylation after sciatic nerve transection in the rat. *Exp. Neurol.* **166**, 392–402.
- Sugiura S., Lahav R., Han J., Kou S. Y., Banner L. R., de Pablo F. and Patterson P. H. (2000) Leukaemia inhibitory factor is required for normal inflammatory responses to injury in the peripheral and central nervous systems in vivo and is chemotactic for macrophages in vitro. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 457–466.
- Taga T. and Kishimoto T. (1997) Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 797–819.
- Tofaris G. K., Patterson P. H., Jessen K. R. and Mirsky R. (2002) Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. *J. Neurosci.* **22**, 6696–6703.
- Watkins L. R. and Maier S. F. (2003) Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 973–985.
- Winkelstein B. A., Rutkowski M. D., Sweitzer S. M., Pahl J. L. and DeLeo J. A. (2001) Nerve injury proximal or distal to the DRG induces similar spinal glial activation and selective cytokine expression but differential behavioral responses to pharmacological treatment. *J. Comp. Neurol.* **439**, 127–139.
- Yamauchi K., Osuka K., Takayasu M., Usuda N., Nakazawa A., Nakahara N., Yoshida M., Aoshima C., Hara M. and Yoshida J. (2006) Activation of JAK/STAT signalling in neurons following spinal cord injury in mice. *J. Neurochem.* **96**, 1060–1070.

ARTICLE 2

La surproduction ciblée de SOCS3 dans les cellules gliales spinales inhibe la voie de signalisation JAK/STAT3 et réduit l'allodynie mécanique chez les rats CCI.

Nous avons montré qu'après une lésion de nerf périphérique le système de transduction JAK/STAT3, principale voie de signalisation de l'IL-6, est activé dans la moelle épinière et participe au développement de l'hypersensibilité douloureuse. Cependant, bien que nos données suggèrent l'implication de cette voie dans la douleur neuropathique post-lésionnelle, son inhibition par l'injection intrathécale d'un agent pharmacologique (AG490) ne réduit que de façon relativement modeste l'hypersensibilité douloureuse des animaux. De nombreuses raisons peuvent expliquer ce manque d'effet et, en particulier, nous devons prendre en compte la spécificité imparfaite de l'inhibiteur vis-à-vis de la kinase JAK2 et le fait que bien que locale, l'administration intrathécale de l'inhibiteur réduira très probablement l'activité JAK/STAT3 également dans les neurones sensoriels. À ce niveau, son inhibition peut avoir des répercussions importantes sur les systèmes impliqués dans la réaction neuronale à la lésion.

La mise en jeu de la voie JAK/STAT3 s'accompagne de l'induction d'expression de son inhibiteur endogène SOCS3. Cette production, limitée dans le temps, semble cependant insuffisante pour restaurer l'état d'activation basal de la voie avant lésion. Nous avons tenté de tirer parti de la spécificité (apparente) de cette protéine endogène et, au travers de sa surproduction locale et à long terme, d'inhiber l'activité JAK/STAT3 de façon ciblée dans la glie de la moelle épinière dorsale.

Nous avons construit un vecteur lentiviral à fort tropisme glial capable d'exprimer la protéine SOCS3 fusionnée avec la protéine tag V5 (LV-SOCS3-V5) nous permettant de discriminer la protéine SOCS3 endogène de celle produite par le vecteur viral. Nous avons ensuite vérifié la capacité du vecteur LV-SOCS3-V5 à produire la protéine transgénique SOCS3-V5 et à diminuer l'activation de la voie JAK/STAT3 *in vitro* sur des cultures primaires de cellules gliales.

À l'aide d'une méthode de microinjection développée au laboratoire, nous avons administré le vecteur LV-SOCS3-V5 dans la corne dorsale de la moelle épinière de rats et examiné l'expression de la protéine SOCS3-V5. Après avoir confirmé l'activation de la voie

JAK/STAT3 spinale dans un troisième modèle de lésion de nerf périphérique, la ligature lâche du nerf sciatique (CCI), nous avons étudié la capacité du vecteur LV-SOCS3-V5 à diminuer l'activation de la voie JAK/STAT3 et l'expression de plusieurs « marqueurs » de neuroinflammation dans la moelle épinière de rats CCI. Enfin, nous avons évalué l'impact de l'injection préventive de LV-SOCS3-V5 sur l'allodynie mécanique induite par la lésion de nerf périphérique.

Après production du vecteur LV-SOCS3-V5, nous avons vérifié l'expression de la protéine transgénique SOCS3-V5 dans des cultures primaires mixtes de cellules gliales. Quarante-huit heures après transduction des cultures avec le vecteur LV-SOCS3-V5, la protéine SOCS3-V5 est détectée.

Afin de tester la capacité du vecteur à inhiber la voie JAK/STAT3, les cellules gliales primaires, préalablement transduites avec le vecteur LV-SOCS3-V5 ou avec le vecteur témoin (LV-EGFP), ont été stimulées par l'IL-6. Dès 15 min, cette stimulation induit, dans les puits témoins ou infectés avec LV-EGFP, la phosphorylation de STAT3. Dans les puits traités avec LV-SOCS3-V5, la phosphorylation de STAT3 induite par l'IL-6 est complètement prévenue. D'autre part, la stimulation par l'IL-6 des cultures primaires de cellules gliales induit, 6h après stimulation, l'expression de plusieurs gènes cibles de la voie JAK/STAT3, COX-2, iNOS et des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-1 β . La transduction de ces cellules avec le vecteur LV-SOCS3-V5, 48h avant le traitement, est capable de réduire l'expression de ces gènes induite par l'IL-6.

Après avoir confirmé *in vitro* la capacité du vecteur LV-SOCS3-V5 à inhiber la voie JAK/STAT3, le vecteur a été injecté dans la corne dorsale de la moelle épinière (niveau L4/L5 spinal). Dans un premier temps, l'injection de LV-SOCS3-V5 chez des rats naïfs nous a permis de vérifier l'expression de la protéine transgénique SOCS3-V5. D'autre part, des expériences d'immunomarquage ont confirmé que l'expression de SOCS3-V5 était bien confinée à la corne dorsale ipsilatérale. Grâce au tropisme majoritairement glial du vecteur choisi (Meunier et al., 2008), la protéine transgénique est effectivement exprimée très préférentiellement dans les cellules gliales de la moelle épinière.

Pour étudier la capacité du vecteur LV-SOCS3-V5 à inhiber la voie JAK/STAT3 médullaire et, surtout, son impact sur la sensibilité douloureuse de l'animal, nous avons choisi de travailler avec un modèle bien validé de douleur neuropathique la ligature lâche du nerf sciatique (CCI). En effet, pour éviter deux interventions chirurgicales (injection intraparenchymale et lésion des nerfs spinaux L5 et L6) dans la même région de la moelle

épineière (partie L5 du renflement lombaire), le modèle SNL n'a pu être retenu. De façon comparable aux autres situations de lésion de nerf périphérique (SNL, SNT), la constriction du nerf sciatique met en jeu la voie de signalisation JAK/STAT3 comme en témoigne l'accumulation de la forme phosphorylée de STAT3 (pSTAT3) dans la corne dorsale de la moelle épinière ipsilatérale à la lésion 48h après CCI. Des expériences de co-marquage ont montré la présence de pSTAT3 notamment dans les cellules microgliales identifiées à l'aide de deux marqueurs spécifiques ITGAM et Iba1. L'immunoreactivité pSTAT3 a également été observée dans de rares neurones (marqués par les anticorps anti-NeuN). En revanche, aucune co-localisation n'a été observée entre pSTAT3 et le marqueur GFAP. L'expression des ARNm SOCS3 (sous contrôle de STAT3) est augmentée dès 48h après CCI. Elle diminue ensuite rapidement mais les concentrations de son ARNm demeurent plus élevées pendant environ 15j après la lésion. Parallèlement, les taux d'ARNm ITGAM (marqueur d'activation microgliale) sont aussi augmentés dès 48h et se maintiennent élevés pendant 21j (temps d'observation maximal) après lésion.

La quantité de pSTAT3 est augmentée dans la moelle épinière dorsale 48h après CCI chez des rats non traités ou préalablement injectés avec le vecteur témoin LV-EGFP. L'injection dans la corne dorsale ipsilatérale à la lésion de LV-SOCS3-V5 diminue l'accumulation de pSTAT3, 48h après CCI. Nous avons évalué ensuite les conséquences de l'injection de LV-SOCS3-V5 sur l'expression de certains gènes sous contrôle direct ou indirect de la voie JAK/STAT3. Ainsi, l'expression des gènes iNOS ou IL-1 β (non présenté), augmentée chez les rats CCI contrôles, n'est pas modifiée par l'injection de LV-SOCS3-V5. En revanche, l'expression de l'IL-6, fortement induite par le CCI, est significativement diminuée chez des rats CCI exprimant SOCS3-V5 15j et 21j après la lésion. Nous nous sommes également intéressés à l'*Activating transcription factor 3* (ATF3), un marqueur de « blessure » neuronale, dont l'expression, augmentée après CCI dans la moelle épinière, est sous influence directe d'IL-6 (Latrémolière et al., 2008). Le traitement par LV-SOCS3-V5 se traduit par une baisse de son expression 15j et 21j après CCI. D'autre part, nous avons évalué le niveau d'expression de la chimiokine MCP-1 (ou CCL2) dont l'implication dans la neuroinflammation spinale et l'hypersensibilité douloureuse ont été montrées récemment. Après CCI, la concentration d'ARNm MCP-1 augmente dans la moelle dorsale ipsilatérale. Quinze jours et 21j après CCI, cette hausse est en grande partie prévenue par l'administration locale de LV-SOCS3-V5.

Enfin, nous avons étudié l'impact de l'inhibition de la voie JAK/STAT3 par l'injection préventive du vecteur LV-SOCS3-V5 sur l'allodynie mécanique qui se développe après CCI.

Les rats traités avec LV-SOCS3-V5 présentent des seuils de réponse significativement plus élevés que les rats CCI non injectés ou injectés avec LV-EGFP à 15j, 21j et 28j après CCI.

Dans ce deuxième article, nous nous sommes attachés à inhiber de façon plus spécifique et, surtout, locale et ciblée la voie JAK/STAT3 activée dans la moelle épinière après lésion de nerf périphérique. L'injection du vecteur lentiviral LV-SOCS3-V5 dans la corne dorsale de rat a permis l'expression en grandes quantités de l'inhibiteur SOCS3 majoritairement dans la glie spinale et l'inhibition de la voie JAK/STAT3 induite par la lésion de nerf périphérique. Cette approche ciblée a permis de diminuer de façon considérable, voire de prévenir à certains temps d'observation, l'allodynie mécanique chez les rats CCI.

De plus, nous avons démontré dans un troisième modèle de lésion de nerf périphérique (CCI) l'activation rapide et prolongée de la voie JAK/STAT3, et confirmé que sa mise en jeu dans la phase précoce intervient notamment dans la microglie. L'activation de cette voie de signalisation semble être un facteur commun à différents modèles de lésions de nerf périphérique.

De façon comparable aux conclusions issues du travail réalisé sur le modèle lésionnel SNL, l'inhibition de l'activité JAK/STAT3 par injection de LV-SOCS3-V5 n'entraîne pas de modification de l'expression d'ITGAM (ARNm, non présenté) chez les rats CCI, suggérant que la voie JAK/STAT3 n'intervient pas de façon majeure dans l'activation microgliale, du moins celle évaluée au travers du marqueur ITGAM. Toutefois, l'expression en grandes quantités de SOCS3 dans la moelle épinière est capable de réduire l'expression anormalement élevée d'IL-6, ATF3 et MCP-1 induite par la lésion CCI. Ainsi, la voie JAK/STAT3 pourrait participer aux autres fonctions de la microglie et réguler l'expression de certains médiateurs inflammatoires.

Le blocage spécifique de la voie JAK/STAT3 ne modifie pas significativement l'augmentation de l'expression spinale d'IL-1 β et d'iNOS induite par la lésion CCI. Ces résultats, en accord avec d'autres travaux, reflètent probablement l'implication de la voie NF- κ B dans la régulation de l'expression de ces deux médiateurs inflammatoires, notamment après CCI (Meunier et al., 2007).

En résumé, l'inhibition ciblée de la voie JAK/STAT3 dans la moelle épinière par surproduction locale de la protéine inhibitrice endogène SOCS3 chez les rats douloureux neuropathiques (CCI) a permis de démontrer le rôle de cette voie de signalisation dans l'hypersensibilité mécanique. L'activation de la voie JAK/STAT3 semble être un maillon

important de la cascade d'évènements inflammatoires qui se développent dans la moelle épinière après lésion de nerf périphérique et qui participent à la genèse de la douleur chronique.

Targeted SOCS3 overproduction in spinal cord glia inhibits JAK/STAT3 signaling pathway and reduces mechanical allodynia in CCI rats.

Elisa Dominguez, Annie Mauborgne, Jacques Mallet, Mathieu Desclaux, and Michel Pohl.

INTRODUCTION

Neuroinflammatory condition in the spinal cord that develops after peripheral nerve injury involves numerous extracellular signaling molecules acting through complex cascades of intracellular signal transduction pathways and potentially participating in alteration of neuronal and glial function. Many of these molecules, including cytokines, growth factors or the neuronal cell membranes components gangliosides may activate JAK/STAT transduction pathway. In the CNS, the member of JAK/STAT signaling family, STAT3, is expressed in many cell types and its active, phosphorylated form, is markedly upregulated after CNS insult and participates on reactive astrogliosis and scar formation (Herrmann et al., 2008). In injured peripheral nerves, the STAT3 signaling is also rapidly activated, promoting axonal regeneration (Sheu et al., 2000; Miao et al., 2006). We recently reported that, in absence of any direct injury of the spinal cord, JAK/STAT3 pathway is also activated in the dorsal spinal cord as a consequence of peripheral nerve injury. The early activation of JAK/STAT3 transduction system is mainly induced by interleukin (IL)-6 in spinal microglia and contributes to neuropathic pain that develops after peripheral nerve alteration (Dominguez et al., 2008). Our initial findings were recently extended by data showing that at the later stages after sciatic nerve injury the adipocytokine leptin also activates the spinal cord JAK/STAT3 pathway and thus participates in associated neuropathic pain (Lim et al., 2009).

The member of suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins family, SOCS3, exerts an important feedback inhibitory control of JAK/STAT3 pathway activity. SOCS3 promoter is under the control of STAT3 transcription factor (Auernhammer et al., 1999; Gatto et al., 2004) and SOCS3 protein interacts with the shared gp130 subunit of IL-6 receptor to avoid STAT3 phosphorylation (i.e. activation) (Nicholson et al., 2000). Peripheral nerve injury-evoked JAK/STAT3 activity in the spinal cord is associated with only transient increase of SOCS3 expression (Dominguez et al., 2008). SOCS3 is rapidly induced and then degraded (Alexander et al., 2002) supporting the finding that physiological levels of SOCS3 seem insufficient to block STAT3 proinflammatory signaling under pathological conditions. However, the potency of overproduced SOCS3 to stem JAK/STAT3 pathway and to limit

some pathophysiological consequences of STAT3-mediated signaling was demonstrated. SOCS3 overexpression in the synovial cells decreased severity of rheumatoid arthritis (Shouda et al., 2001) and intraperitoneal administration of cell-penetrating form of SOCS3 inhibited inflammation and liver apoptosis after toxic choc (Jo et al., 2005).

Here, we explored the possibility to selectively inhibit JAK/STAT3 signaling in the spinal cord glia by enhancing the local production of endogenous inhibitory protein SOCS3. We generated lentiviral-derived vectors (LV) presenting a preferential tropism for glial cells in the spinal cord (Meunier et al., 2007, 2008) to drive the expression of tagged rat SOCS3 (LV-SOCS3t), and assessed their effects on JAK/STAT3 activity, downstream signaling responses and pain hypersensitivity in a well validated model of peripheral nerve injury evoked neuropathic pain in rat (Bennett and Xie, 1988).

MATERIALS AND METHODS

Plasmids

The expression plasmid pTrip-CMV-WPRE, gift from Hammid Mammeri (UMR CNRS 7091, Paris, France), was used to produce LV vectors. Coding sequence of rat SOCS3 followed by the tag sequence V5 (5' *ggaagcctatccctaaccctctcctcggtctcgattctacg* 3') or of EGFP were inserted (*BamHI/XhoI*) under the transcriptional control of CMV promoter in pTrip-CMV-WPRE. The transcomplementation plasmid p8.91, and the plasmid encoding the vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein, VSV-G (pMD-G), have been described previously (Zufferey et al., 1997).

Lentiviral vector production

Pseudotyped HIV vectors were produced as described previously (Zennou et al., 2001; Meunier et al., 2008). Briefly, 293T cells were co-transfected with pTrip-SOCS3t-WPRE or pTrip-EGFP-WPRE, p8.91 and pMD-G using calcium phosphate DNA precipitation method. Viral particles were obtained by ultracentrifugation (56,000 x g, 1.5 h, 4°C) of the supernatants and resuspended in phosphate buffered saline (D-PBS, Invitrogen, Cergy, France). After elimination of remaining cellular debris by successive low speed centrifugations, final viral suspension was stored at -80°C until use. Lentiviral suspension was titrated and normalized for the p24 antigen (Beckmann Coulter, Roissy, France).

Glial cell primary cultures

Primary mixed glial cultures were prepared from the cerebral cortex of 4-day-old rat pups (Sprague-Dawley, Centre d'Elevage R. Janvier, Le Genest-St Isle, France) following slight modifications of the procedure described by Goslin et al. (Goslin et al., 1998). Briefly, hemispheres from 6-7 pups were dissociated in Hank's balanced salt solution (HBSS) containing 50 mM HEPES and centrifuged (400 x g; 30 s). The pellet was resuspended in 10 ml of HBSS containing 50 mM HEPES, 0.25 % trypsin and 0.2 mg/ml Dnase I, incubated 15 min at 37°C and after addition of 5% BSA the cell suspension was centrifuged (400 x g; 10 min) and the pellet was resuspended in 50 ml of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum and 1% (w/v) penicillin/streptomycin (complete culture medium). The suspension was centrifuged as above until a clear supernatant was obtained and the final pellet was resuspended in complete medium and seeded at the density of 1×10^4 cells/cm² in 75-cm² culture flask (Costar, VWR International, Fontenay-sous-Bois, France). The medium was changed every 3 days.

For immunofluorescence or Western blot and conventional semi-quantitative PCR (RT-PCR) experiments, glial cells were plated at the density of 2×10^5 cells/cm² in four-well plates containing poly-D-lysine coated coverslips or in six-well plates, respectively. Cells were infected with 35 or 350 ng of p24/ml of LV-EGFP or LV-SOCS3t. Forty-eight hours later, cells were serum-starved overnight before treatment with 50 ng/ml of recombinant rat IL-6 (Peprotech, Paris, France). Cells were further incubated during 15 min, extensively washed and then processed for Western blot analyses. RT-PCR experiments were performed on total RNA extracted from cells incubated for 6h in the presence of IL-6.

Animals

Animals used in this study (adult male Sprague Dawley rats, 200 g; Centre d'Elevage Janvier, Le Genest-St Isle, France) were maintained under controlled conditions (22 +/- 1°C, 60 +/- 10% relative humidity, 12h/12h light/dark cycle, food and water *ad libitum*). All experiments were performed in conformity with the institutional guidelines that are in compliance with national and international law and policies for use of animals in neurosciences research (European Communities Council Directive No. 87848, October 1987, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale; Permission No. 6186 to M.P.).

Viral vector delivery into the dorsal horn of the lumbar spinal cord

Intraparenchymal injection of lentiviral vectors was performed as previously described (Meunier et al., 2008) with slight modifications. Briefly, rats were deeply anaesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg, i.p.) To avoid movements caused by breathing, animal's spine was maintained with two specific bars placed around the L3 vertebra. Under a Zeiss operation microscope (10-25X), the thoracic T13 vertebra was carefully drilled to access to left side of the lumbar spinal cord. After an incision in the intact dura mater and arachnoid mater, 2 μ l (~70 ng p24) of lentiviral vectors (LV-EGFP or LV-SOCS3t) were delivered using a glass-micropipette connected to an automatic microinjection device (KDS 3010, KD Scientific, Holliston, MA). Muscles and skin were closed with resorbable 4/0 Ethicon stiches (Johnson and Johnson, New Brunswick, NJ) and rats were then housed in individual and clean cages to recover.

Chronic constriction injury of the sciatic nerve (CCI)

Non injected, sham injected (LV-EGFP) and LV-SOCS3t-injected rats (1 week post infection) were anaesthetized with 3% isoflurane in O₂ at 3 l/min and maintained with 1.5% isoflurane in O₂ and their left sciatic nerve was exposed at the level of the mid-thigh. According to the method described by Bennett and Xie (Bennett and Xie, 1988), four loose ligatures (5-0 chromic catgut, about 1-mm spacing) were placed around the nerve, taking care of not interrupting the epineural circulation. The day of the surgery was referred as day 0. Sham operated animals were subjected to the same surgery protocol as CCI animals excepting that the exposed sciatic nerve was not constricted.

Behavioral testing

After arrival in the laboratory, animals were left to become accustomed to the animal care unit for 2 days. Behavioral analyses were realized in a completely blind manner. To avoid stress resulting from experimental conditions, all manipulations were performed in quiet conditions in a test room by the same experimenter. During 7 days before the experiments, animals were placed in the test room for 1 h (from 12.00 a.m. to 1.00 p.m.), then gently handled during 5 min and left to become acclimated in suspended cages with wire mesh buttons.

Mechanical allodynia was determined as described by Chaplan et al. (Chaplan et al., 1994). The ipsilateral and contralateral hindpaws were probed with calibrated von Frey filaments (Bioseb, Vitrolles, France) applied perpendicularly to the plantar surface and held for approximately 5 seconds. A positive response was indicated by a sharp withdrawal of the

paw. The 50% paw withdrawal threshold was determined by the non-parametric method of Dixon (1980), in which the stimulus was incrementally increased until a positive response was obtained, and then decreased until a negative result was observed. The protocol was repeated until three changes in behavior were determined and the pattern of positive and negative responses was tabulated. The 50% paw withdrawal threshold was determined as $(10^{[Xf+k\Delta]})/10,000$, where Xf = the value of the last von Frey filament employed, k = Dixon value for the positive/negative pattern, and Δ = the logarithmic difference between stimuli.

Conventional RT-PCR and real-time RT-PCR analysis

Rats were killed by decapitation and the lumbar part of the spinal cord was removed in the cold (0–4°C). The lumbar enlargement (L5–L6) was divided into left (injected and lesioned side) and right parts by sagittal cut, and then into their dorsal and ventral zones by a horizontal cut passing through the ependymal canal. Left dorsal quadrants of the spinal cord were frozen immediately in liquid nitrogen and then stored at -80°C until they were used. Total RNA were extracted from frozen pieces of tissues using NucleoSpin® RNA II Purification Kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) and their quality and concentrations were evaluated by optical density using NanoDrop (Thermo Scientific, Labtech France, Palaiseau, France).

Reverse transcriptions immediately followed by polymerase chain reactions were performed using Access RT-PCR System (Promega, Charbonnières, France) on 0.5 µg of each RNA sample. Reverse-transcribed RNA were amplified with 30 cycles (96°C, 58°C, and 72°C; 1 min each) using 40 pmol of specific primers (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [GPDH], house-keeping gene *-sense- 5' accacagtccatgccatcac 3'*, *-antisense- 5' tccaccaccctgttctgta 3'*; IL-6 *-sense- 5' tgttctcaggagatcttgg 3'*, *-antisense- 5' tccaggtagaaacggaactc 3'*; IL-1β *-sense- 5' tccatgagctttgtacaagg 3'*, *-antisense- 5' ggtgctgatgtaccagttgg 3'*; COX-2 *-sense- 5' caacctgctgactgaacctg 3'*, *-antisense- 5' gacacaatcaaactttatttcagaag 3'*; inducible nitric oxide synthase [iNOS] *-sense- 5' caccttggagttcaccagt 3'*, *-antisense- 5' accactcgtacttgggatgc 3'*) following manufacturer's protocol. The RT-PCR products were electrophoresed in 1.2% ethidium bromide-stained agarose gel, quantified with the gel analyzer GDS 5000 (Ultra-Violet Products Ltd., Cambridge, UK) and the ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Transcripts quantities in samples were normalized with reference to GPDH.

For real-time RT-PCR analysis, first-strand cDNA synthesis (0.6 µg total RNA per 20 µl reaction) was carried out with High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied

Biosystems, Courtaboeuf, France). Real-time PCR amplification of each sample in triplicate was performed on the ABI Prism 7300 apparatus (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) using ABgene Absolute QPCR ROX Mix (ABgene, Courtaboeuf, France) and the Assay-on-Demand Gene TaqMan PCR probes (Applied Biosystems) were used for target genes : SOCS3 (Rn00585674_s1), ITGAM (Rn00709342_m1), IL-6 (Rn00561420_m1), ATF3 (Rn00563784_m1), CCL2 (Rn00580555_m1), iNOS (Rn00561646_m1) and glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase (GPDH) (Rn99999916_s1). To perform semi-quantitative studies, GPDH was used as reporter gene.

Western blotting

Cells were washed 3 times in ice-cold PBS 1X and were scrapped in 1 ml of this solution. Samples were centrifugated (1,500 x g, 3 min, 4°C) and pellets were resuspended in RIPA buffer containing 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF and proteases and phosphatases inhibitors cocktails (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Samples were stored at -80°C until use.

Left dorsal quadrant of the rat lumbar spinal cord was dissected out as described for RT-PCR experiments. Frozen tissue pieces were placed in ice-chilled Dounce homogenizer, homogenized on ice in 170 µl of RIPA buffer (20 mM Tris pH=7.5, 150 mM NaCl, 1 % NP40, 0.5 % Na deoxycholate, 1 mM EDTA, 0.1 % SDS) supplemented with proteases and phosphatases inhibitors cocktails (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Samples were centrifuged (10,000 x g, 10 min, 4°C) and supernatants were centrifuged one more time. Equal concentrations of proteins, as determined by Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Paris, France) were mixed with standard Laemmli buffer, sonicated, heated at 95°C for 1 min, then separated by SDS-PAGE gel (10 % acrylamide) and electro-transferred (Trans-Blot SD, Bio-Rad) onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad). Membranes were first saturated in blocking solution (5% nonfat dry milk, 0.1 % Tween 20 in PBS 1X) for 1 h at room temperature then incubated (overnight, 4°C) with mouse anti-V5 (1/250, Invitrogen, France), rabbit anti-SOCS3 (1/100, IBL, Germany) or rabbit anti-pSTAT3 (tyr 705, 1:500, Cell Signaling Technology) in the blocking solution. After rinsing with PBS-T (PBS 1X, 0.1 % Tween 20), blots were incubated (40 min, room temperature) with HRP-linked anti-rabbit Ig (1:5000, Sigma, France) in the blocking solution. Blots were finally washed in PBS-T, then in PBS. Membranes were processed with ECL Plus kit and exposed to MP-ECL film (GE Healthcare Life Sciences, Orsay, France). After washing in PBS-T, membrane was stripped in Tris HCl 32.5 mM pH 6.7, 2% SDS, 100 mM β-mercaptoethanol before incubation with rabbit anti-

STAT3 antibody (1:750, Cell Signaling Technology) and with mouse anti- α -tubulin (1:10000, Amersham Biosciences). Relative intensities of the pSTAT3 and STAT3 immunoreactivity compared to the α -tubulin control were evaluated on scanned images of the blots.

Immunocytochemistry

Primary antibodies used for this study were mouse anti-V5 (1/200, Invitrogen, France), goat anti-SOCS3 (1/100, Santa Cruz Biotechnologies, Tebu, France), goat anti-pSTAT3 (Tyr705; 1/150, Santa Cruz Biotechnologies, Tebu, France), mouse anti-GFAP (1:5000, Chemicon International, Temecula, USA), mouse anti-CD11b (ITGAM) (1:120, Serotec, Oxford, UK), rabbit anti-Iba1 (1:800, Wako, Coger, France) and mouse anti-NeuN (1:1000, Chemicon International). Secondary antibodies used were Alexa 488- or 594-conjugated donkey anti-rabbit, anti-mouse and anti-goat Ig (1:500, Invitrogen, France).

Cells were processed for immunofluorescence as described in Meunier et al., 2008. Briefly, after fixation in 4% paraformaldehyde in PBS, coverslips with cells were washed with PBS containing 0.1 mM CaCl₂ and 0.1 mM MgCl₂ (PBS+) and then incubated with blocking buffer (3% donkey serum and 0.3 % Triton X-100 in PBS+). Cells were incubated in the same buffer supplemented with primary antibody (2 h, RT). After washing with PBS+, secondary antibodies were incubated in the blocking buffer (1 h, RT). Coverslips were rinsed (PBS+) and mounted in Fluoromount-G solution (Clinisciences, Montrouge, France).

Animals were deeply anaesthetized with pentobarbital and perfused transcardially with 100 ml of 0.9% NaCl supplemented with 0.1% sodium nitrite, followed by 800 ml of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer supplemented with 0.8% picric acid at room temperature. Lumbar spinal cords were dissected out and cryoprotected in 10% sucrose (24 h, 4°C). Twenty micrometers cryostat sections were preincubated (1 h, room temperature) in a 1X PBS buffer containing 3% donkey serum (Interchim, Montluçon, France) and 0.3 % Triton X-100. Sections were incubated in the same buffer supplemented with primary antibodies overnight at 4°C. After being washed (3x10 min, PBS 1X), sections were incubated for 1 h at room temperature with secondary antibodies, rinsed in PBS and mounted in Fluoromount-G solution (Clinisciences, Montrouge, France).

Slides were observed and images were generated using a Zeiss microscope (Axio Imager M1, AX10, Zeiss, Le Pecq, France) and AxioVision 4.7 Software (Zeiss, Le Pecq, France).

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM. Data from RT-PCR, western blots, and behavioral experiments were validated using one-way ANOVA followed by Student t test. Statistical evaluation was performed with STATVIEW 5.0 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). When $p > 0.05$, the corresponding difference was considered to be non-significant.

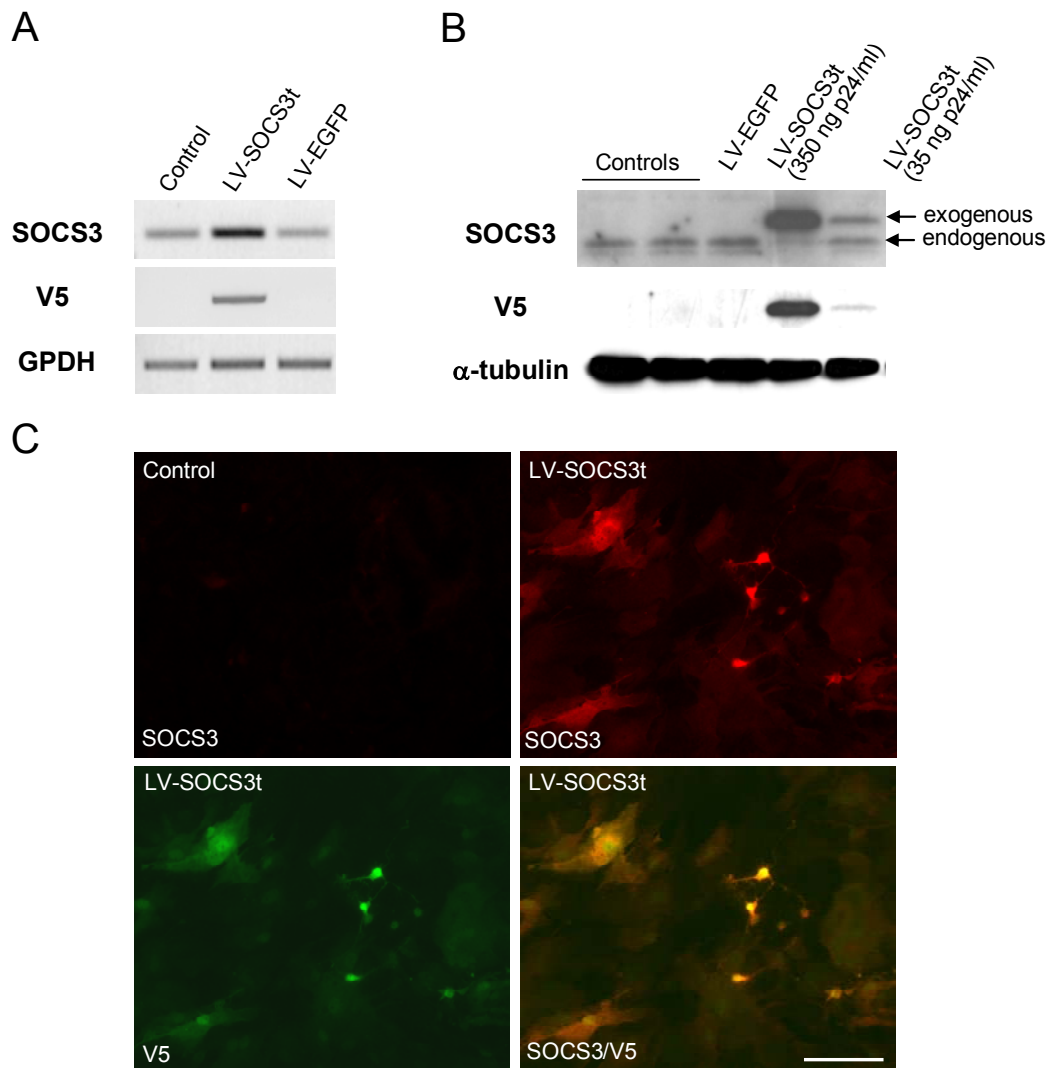


Figure 1: Expression of *SOCS3t* in rat primary glial cells cultures. **A/** Two days after transduction, expression of *SOCS3* mRNA and detection of the tag sequence *V5* were assessed using conventional RT-PCR performed on 0.5 μ g of total RNA extracted from *Control* (untreated), transduced with *LV-EGFP* (control lentiviral vector) or *LV-SOCS3t* primary glia. *SOCS3* and *V5* specific amplifications were compared with amplification from control *GPDH* mRNA. **B/** Western blotting experiments were performed with *SOCS3* or *V5* specific antibodies on total proteins extracted from primary glial cells, 2 days after transduction. Alpha-tubulin was used as a loading control. **C/** Primary glial cells were processed for immunocytochemistry with *SOCS3* (in red) and *V5* (in green) specific antibodies 2 days after transduction with *LV-SOCS3t*. *Control* (untreated cells). Scale bar = 50 μ m.

RESULTS

I. SOCS3-V5 production from LV-SOCS3t

Transduction of rat primary glial cells cultures with LV-SOCS3t resulted in expression of transgene-derived SOCS3 transcripts as documented by the detection of the tag sequence V5 (Fig. 1A). Western blotting experiments of total proteins extracted from glial cells transduced with increased titers of LV-SOCS3t, revealed a titer-dependent production of the transgene-derived SOCS3t (Fig. 1B). Immunohistochemistry performed 48 h after transduction of primary glial cells with LV-SOCS3t revealed a co-localization between SOCS3 immunoreactive material (IR) and V5-IR in transduced glial cells (astrocytes and microglia), confirming expression of the exogenous form of SOCS3 (SOCS3t, Fig. 1C). Production of the transgene-derived SOCS3t-IR was further detected in transduced 293 T and BV2 (microglial cell line) cells (data not shown).

II. LV-SOCS3t attenuated IL-6-evoked STAT3 phosphorylation and subsequently induced production of inflammatory markers

Incubation of primary glial cells with IL-6 (50 ng/ml) resulted in a rapid phosphorylation of STAT3 in 15 minutes. As shown in Fig. 2A, this IL-6 induced accumulation of pSTAT3 was abolished in cells transduced with LV-SOCS3t (350 or 35 ng p24/ml, $p < 0.001$ when compared with pSTAT3 levels in non-transduced IL-6 treated cells). Comparable results were obtained in microglia cell line BV2 stimulated with IL-6 and infected or not with LV-SOCS3t (not shown). A 6 h application of IL-6 on primary glial cells elicited an increase of mRNA levels of IL-6 itself ($x 5.86 \pm 0.56$, $p < 0.01$) and of several others inflammatory markers: IL-1 β ($x 2.45 \pm 0.41$, $p < 0.05$), inducible NO synthase (iNOS, $x 3.95 \pm 0.54$, $p < 0.01$), cyclooxygenase 2 (COX-2, $x 1.9 \pm 0.16$, $p < 0.05$) as compared to control, untreated glial cells. Transduction of primary glial cells with LV-SOCS3t, 48 h before cell cultures were stimulated with IL-6, significantly reduced the IL-6-induced enhancement of expression of these genes. Accumulation of IL-1 β , iNOS and COX-2 mRNAs was inhibited only with the high titer (350 ng p24/ml) of LV-SOCS3t (IL-1 β : -57.13 ± 5.27 %, $p < 0.05$; iNOS: -46.95 ± 11.01 %, $p < 0.05$; COX-2: -31.97 ± 2.12 %, $p < 0.05$) whereas IL-6-evoked expression of IL-6 itself was significantly reduced even with the lowest LV-SOCS3t titer used (35 ng p24/ml: -56.51 ± 5.36 %, $p < 0.001$; 350 ng p24/ml: -66.97 ± 7.83 %, $p < 0.001$) (Fig. 2B). Similar experiments were performed on glial cells infected with high titer of LV-EGFP (350 ng

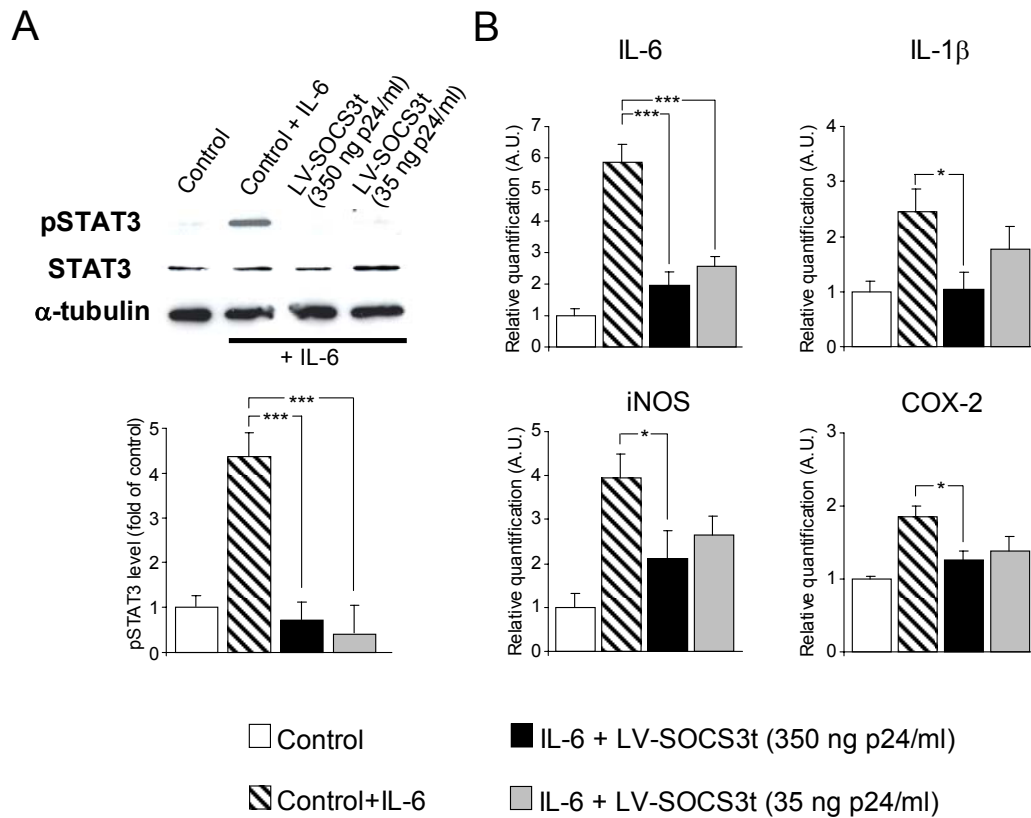


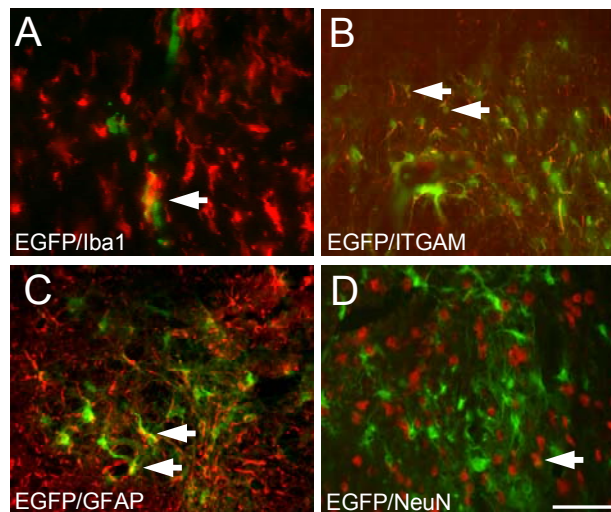
Figure 2: Effect of LV-SOCS3t transduction on activation of JAK/STAT3 pathway in primary glial cells.

A/ Thirty minutes after stimulation with IL-6 (50 ng/ml), STAT3 activation was evaluated in western blot experiments with specific antibodies against phosphorylated (at tyr705) form of STAT3 (pSTAT3) and anti-STAT3 (STAT3) antibodies. *Control* (untreated cells). Alpha-tubulin was used as a loading control. For each experimental condition, relative density of pSTAT3 labeling was normalized to individual relative densities of STAT3 within the same blot and is presented in relation to control (basal) condition (*lower panel*). **B/** Six hours after stimulation with IL-6 (50 ng/ml), conventional semi-quantitative RT-PCR was performed with specific primers on 0.5 μ g of total RNA extracted from *control* or LV-SOCS3t-transduced glial cells. Data (n = 4 for each group) are expressed in arbitrary unit (A.U.) representing 260 nm optical density of specific RT-PCR products/260 nm optical density of GPDH RT-PCR products. Results represent means \pm SEM of 4 independent experiments. * p<0.05, *** p<0.001.

p24/ml). This treatment inhibited neither the accumulation of pSTAT3, nor the increased concentrations of mRNA of inflammatory markers evoked by the stimulation of cells with IL-6 (data not shown).

III. LV-SOCS3t injection into the rat dorsal spinal cord induced a local long-term expression of SOCS3t

Injection of LV vectors into the rat dorsal horn of the spinal cord resulted in transgene expression preferentially in glial cells, whereas only limited number of neurons expressed low levels of transgene product (supplementary Fig., and previously reported data Meunier et al., 2007, 2008).



Supplementary figure: Cellular localization of EGFP expression in spinal cord of rat injected with LV-EGFP. One week after injection of LV-EGFP (2 μ l, i.e. \sim 70 ng of p24), 20 μ m slices of rat dorsal spinal cord were stained with specific antibodies against glial or neuronal markers (*in red*). EGFP expression (*in green*) was compared to immunostaining with microglial markers Iba1 (A) or ITGAM (B), astrocytes marker GFAP (C) and neuronal marker NeuN (D). EGFP fluorescence was mainly localized in glial cells and only rarely in NeuN labeled neurons. Examples of double-labeled cells are showed with white arrows. Scale bar = 50 μ m.

Control LV-EGFP or LV-SOCS3t were microinjected unilaterally into the rat dorsal horn of the spinal cord. Two days after LV-EGFP administration (70 ng p24), SOCS3 mRNA concentration was slightly increased ($\times 2.20 \pm 0.32$ as compared to naïve controls, $p < 0.05$, $n = 3$). This increase was transient as one week later, SOCS3 mRNA concentration returned to control values (not shown). On the other hand, intraparenchymal administration of 2 μ l of

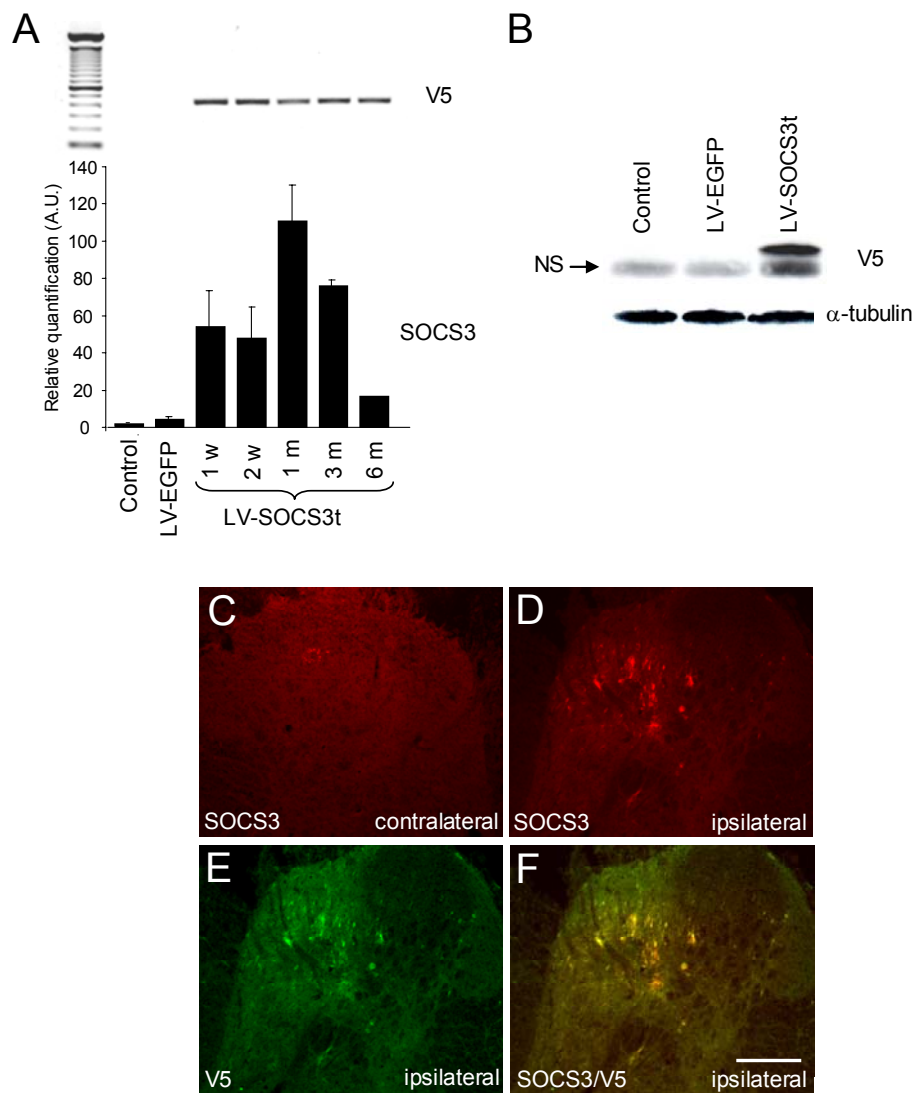


Figure 3: Expression of *SOCS3t* in the dorsal horn of the rat spinal cord after local intraparenchymal injection of *LV-SOCS3t*. **A/** At different time points after injection of *LV-SOCS3t* (2 μ l, i.e. \sim 70 ng of p24), total RNA extracted from ipsilateral dorsal part of the spinal cord were subjected to semi-quantitative conventional or real-time RT-PCR experiments with specific primers for *V5* (upper panel) or *SOCS3* (lower panel), respectively. Data from conventional RT-PCR are representative from different sets of injected animals. For real-time RT-PCR, each bar is the mean \pm SEM (n = 4, excepting 6 month post-injection time n = 2). Control: non injected animals. A.U.: arbitrary unit. **B/** One week after injection of *LV-SOCS3t*, western blotting analysis was performed on total proteins extracted from ipsilateral dorsal part of the spinal cord using *V5* specific antibodies (NS: non specific band). Alpha-tubulin was used as a loading control. Blots are representative of 3 independent experiments performed with distinct set of animals (n = 3 per condition) Control: non injected animals. **C/** One week after injection of *LV-SOCS3t*, rats were sacrificed and their spinal cord was processed for immunohistochemistry experiments. Tissue slices (20 μ m) were stained with *SOCS3* (in red) and *V5* (in green) specific antibodies. Note the complete overlapping of *SOCS3* and *V5* labeling confirming the transgene origin of spinal cord *SOCS3*-IR. Scale bar = 200 μ m.

LV-SOCS3t (≈ 70 ng p24) allowed a sustained overexpression of SOCS3 mRNA (real-time semi-quantitative RT-PCR) and concomitant expression of the V5 tag sequence (detected using conventional RT-PCR) from 1 week until 6 months post injection (SOCS3 mRNA levels: 1 w x 54.34 ± 19.25 , $p < 0.001$, $n = 4$; 6 m x 16.62 $n = 2$; compared to control naïve rats) (Fig. 3A). In the contralateral dorsal horn of the spinal cord (non-injected), SOCS3 mRNA levels remained comparable to those measured in control naïve rats and no specific V5 amplification was observed (data not shown). Western blot analysis performed using anti-V5 specific antibodies one week after spinal administration of either LV-EGFP or LV-SOCS3t further confirmed the specific production of transgene-derived SOCS3t protein in spinal cord from rats injected with LV-SOCS3t. V5-IR was detected in spinal cord extracts from neither control naïve animals, nor from LV-EGFP-injected rats (Fig. 3B).

Immunohistofluorescence experiments using anti-rat SOCS3 antibodies revealed no SOCS3-IR in the spinal cord of control naïve rats (not shown). Similarly, as illustrated in Fig. 3C, one week after intraparenchymal injection of LV-SOCS3t, no endogenous SOCS3-IR was detected in the non-injected side of the dorsal spinal cord (right part of the spinal cord). By contrast, in the left part of the spinal cord injected with LV-SOCS3t, immunohistofluorescence experiments revealed SOCS3-IR (*in red*) that was closely restricted to the dorsal horn. Furthermore, this SOCS3 labeling showed a complete overlapping with V5-IR (*in green*) strongly suggesting that accumulated SOCS3-IR indeed derived from LV-SOCS3t (Fig. 3C).

IV. Chronic constriction injury (CCI) of the rat sciatic nerve results in activation of JAK/STAT3 pathway in the lesioned-side dorsal spinal cord

Activation of STAT3 in the spinal cord was assessed using the phospho-STAT3 (Tyr705) specific antibody. Our previous data from spinal nerve ligation (SNL, Dominguez et al., 2008) and sciatic nerve trans-section (unpublished observations) models of nerve injury showed that accumulation of pSTAT3-IR in spinal cord was maximal 24 to 48 h after the nerve lesion. We thus evaluated pSTAT3 accumulation and its localization in spinal cord 48 h after CCI. Phosphorylated STAT3-IR was neither detected in spinal cord from sham-operated animals (not shown), nor in the side contralateral to the constricted sciatic nerve in CCI rats (Fig. 4A). In the ipsilateral spinal cord, CCI animals presented a clear-cut accumulation of pSTAT3-IR in the superficial and medial laminae (I-V) of the dorsal horn (Fig. 4B). Double labeling immunohistofluorescence experiments with markers of microglia (ITGAM and Iba1), astrocytes (GFAP) or neurons (NeuN) were performed in order to characterize the cell(s)

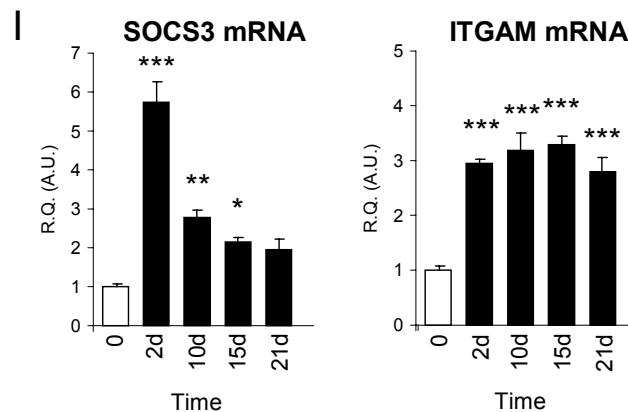
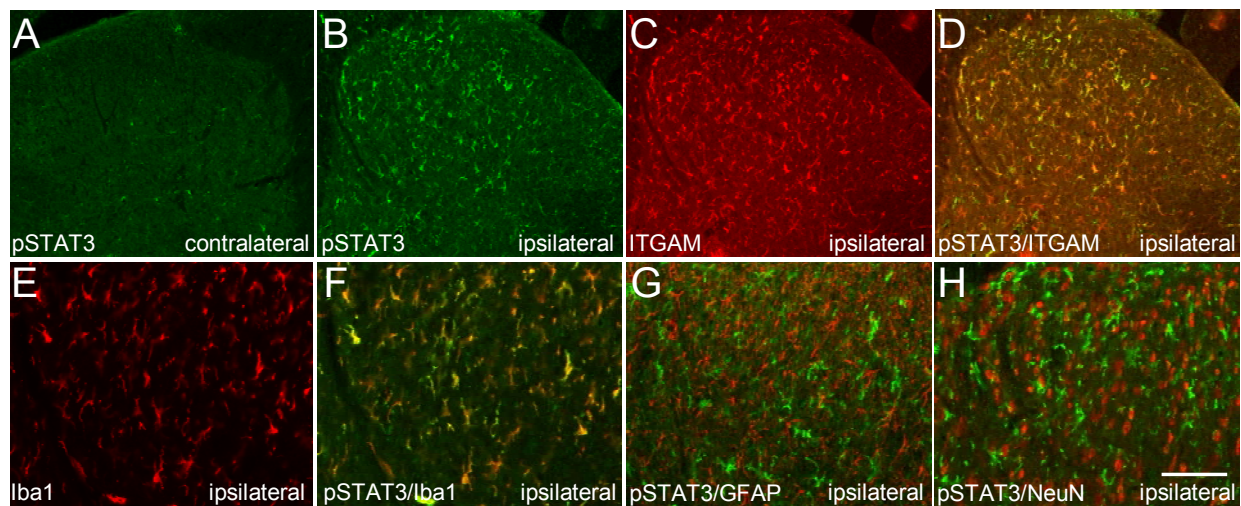


Figure 4: Activation of the JAK/STAT3 pathway in spinal cord of CCI rats.

Two days after CCI surgery, rats were sacrificed and processed for immunocytochemistry. Slices of 20 μ m were stained with pSTAT3 antibodies (tyr705, *in green*) and specific antibodies (*in red*) against markers of microglia (ITGAM, Iba1), astrocytes (GFAP) and neurons (NeuN). In the spinal cord of CCI rats, pSTAT3-IR was almost undetectable in the contralateral dorsal horn (A) whereas dense pSTAT3-IR labeling was present in superficial and medial laminae (I-V) of the ipsilateral dorsal horn (B). Enhanced ITGAM-IR or Iba1-IR staining, attesting for microglial activation, was also observed in ipsilateral dorsal horn 48h after CCI (C and E). Double-labeling experiments for pSTAT3- (*in green*) and either ITGAM- (D) or Iba1-IR (F) revealed a close co-localization between pSTAT3 and both microglial markers. Co-labeling with anti-GFAP antibodies (G) showed almost no pSTAT3-IR (*in green*) in astrocytes and scarce neurons stained with NeuN antibodies (H) displayed weak pSTAT3-IR (*in green*). Scale bar = 200 μ m for A to D and 100 μ m for E to H.

I/ At different time points after CCI surgery, total RNA extracted from ipsilateral dorsal part of the spinal cord were subjected to real-time semi-quantitative RT-PCR experiments with specific primers for SOCS3 or ITGAM. Data were representative from different sets of operated animals (n = 4 for each group [time point]). 0: Control non- and sham-operated animals. R.Q. Relative quantification, A.U.: arbitrary unit. Data represent mean \pm SEM. n = 3 for each time point, * p < 0.05, ** p < 0,01, *** p < 0.001 versus control (naive and sham-operated) rats.

type(s) containing pSTAT3-IR. As illustrated in Fig. 4C-D, microglial cells were activated after CCI injury in the ipsilateral dorsal horn and frequently displayed pSTAT3-IR. The same labeling pattern, showing that pSTAT3-IR mainly accumulated in microglial cells, was observed using another microglial marker Iba1 (Fig. 4E-F). Whereas GFAP-marked astrocytes presented no overlapping labeling with pSTAT3-IR (Fig. 4G), some scarce spinal cord neurons were double labeled for NeuN and pSTAT3-IR (Fig. 4 H).

To further evaluate the CCI-evoked activation of JAK/STAT3 signaling pathway in the spinal cord ipsilateral to the lesion, we determined the expression profile of the STAT3 target gene SOCS3. Real-time semi-quantitative RT-PCR showed that sciatic nerve injury was associated with markedly enhanced levels of SOCS3 mRNA in the ipsilateral dorsal spinal cord (Fig. 4I). As compared to basal levels measured in sham animals, SOCS3 mRNA concentration was importantly elevated 2 d after CCI, then progressively decreased to reach non-statistical difference 21 days after nerve injury (D2: $x 5.75 \pm 0.95$, $p < 0.001$; D10: $x 2.80 \pm 3.02$, $p < 0.01$; D15: $x 2.18 \pm 1.93$, $p < 0.05$). At the same time, expression of ITGAM gene, the marker of microglial activation, was also up-regulated 2 d after nerve injury (D2: $x 2.96 \pm 0.83$, $p < 0.001$ compared to sham animals) and remained then elevated during the next 21 d of the experimental procedure (D21: 2.81 ± 0.50 , $p < 0.001$).

V. LV-SOCS3t attenuates the development of CCI-evoked mechanical hypersensitivity

CCI (or sham-) surgery was performed on animals one week after they received (or not) the spinal cord injection of either LV-EGFP or LV-SOCS3t. Behavioral experiments were then performed 2, 3 and 4 weeks after CCI. In agreement with our previously reported data (Meunier et al., 2007, 2008), vectors delivery into the spinal cord of rats did not modify their basal pain sensitivity (not shown). Comparably, mechanical pain sensitivity of sciatic nerve sham-operated rats assessed with von Frey filaments was not significantly different at any time point studied from that of naïve animals (not shown). As shown in Fig. 5, CCI-injury resulted in a robust mechanical allodynia that appeared 2 weeks after the nerve constriction and lasted for at least 1 month. The CCI-evoked mechanical hypersensitivity in non injected rats was undistinguishable from that in LV-EGFP-injected rats. Data from both groups were thus pooled and referred as control-CCI sham injected rats. By contrast, in rats which dorsal spinal cord was injected with LV-SOCS3t, CCI resulted in strongly attenuated mechanical hypersensitivity all along the observation period as compared to that developing in control-CCI rats (D15: $p < 0.01$; D21: $p < 0,001$, D28: $p < 0.01$). In fact, as compared to basal pain sensitivity of sham-operated rats, in CCI-LV-SOCS3t-injected rats mechanical

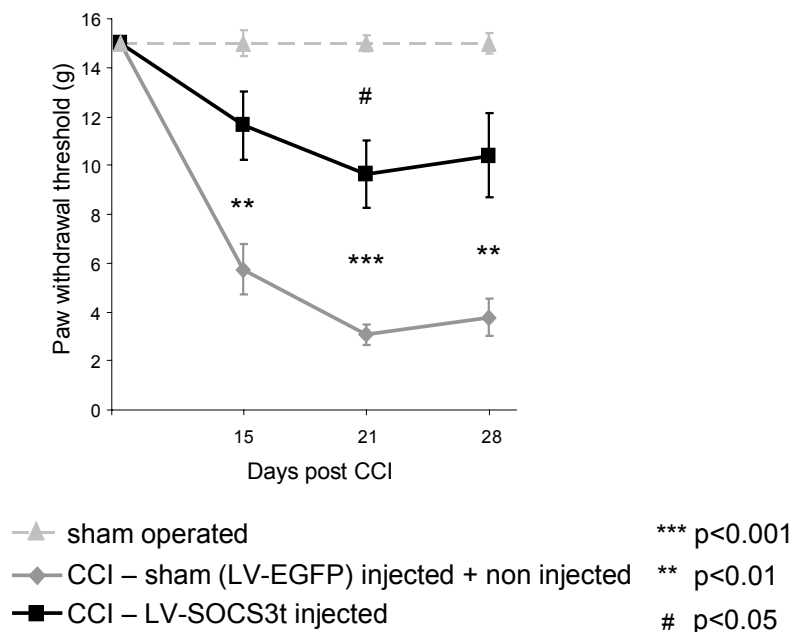


Figure 5: *Nociceptive thresholds to mechanical stimulation of CCI rats after injection of LV-SOCS3t.* Basal nociceptive threshold (0) was determined in rats that were then separated in several groups. Some animals received spinal cord injection of either LV-EGFP or LV-SOCS3t. One week later, animals underwent sham-operation or CCI of the sciatic nerve. Behavioural studies started 15 days after the surgery in sham operated, CCI-non injected, CCI-sham injected (LV-EGFP-injected) and CCI-LV-SOCS3t-injected rats. Sensitivity to mechanical stimulation was evaluated using Von Frey filaments. Filaments were applied perpendicularly to the plantar surface and the stimulus was incrementally increased until a positive response was obtained, and then decreased until a negative result was observed. The protocol was repeated until three changes in behavior were determined. As CCI-induced mechanical allodynia in naïve rats was statistically not different from that developing in LV-EGFP-injected rats, data from both groups were pooled and are presented as control CCI-sham injected animals. All along the experiment, mechanical allodynia was statistically different between control sham-operated and control-CCI animals ($p < 0.0001$). Data represent mean \pm SEM. $n = 10$ for each group, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus CCI-sham injected, # $p < 0.05$ versus sham-operated. Note that mechanical hypersensitivity of CCI rats treated with LV-SOCS3t was statistically different from that measured in sham-operated control rats only at the 3 w time point after the surgery.

hypersensitivity was statistically significant only 3 w after nerve injury, when mechanical allodynia induced by CCI of the sciatic nerve peaked (D15: $p > 0.05$; D21: $p < 0,05$, D28: $p > 0.05$).

VI. LV-SOCS3t reduces the CCI-associated STAT3 phosphorylation and -enhanced expression of inflammatory signaling molecules in the spinal cord

To evaluate the relationship between the spinal cord LV-mediated SOCS3 overproduction and the attenuated mechanical allodynia developing after CCI, we assessed the activation status of STAT3 and monitored the expression profile of several markers known to be upregulated in the spinal cord of CCI rats. When compared with sham operated rats, western blot experiments, performed 2 w after CCI, showed increased levels of pSTAT3-IR in the dorsal horn of both non injected CCI (3.2-fold, $p < 0.001$) and LV-EGFP-injected CCI (2.9-fold, $p < 0.001$) rats (Fig. 6A). In the spinal cord of CCI rats treated with LV-SOCS3t, pSTAT3-IR levels were markedly reduced ($p < 0.001$), frequently back to or even under the basal levels. In addition to this inhibited accumulation of pSTAT3-IR, the potency of LV-SOCS3t to block the STAT3-mediated signaling was further documented by the downfall of mRNA concentration in the spinal cord of several markers associated with inflammatory conditions evoked by CCI. Thus, 2 and 3 w after CCI, the time points that corresponded to markedly attenuated mechanical allodynia in LV-SOCS3t treated CCI rats, expression of inflammatory mediators IL-6 (D15: $- 82.4 \pm 8.2 \%$, $p < 0.05$; D21: $- 93.2 \pm 3.4 \%$, $p < 0.001$), CCL2 (D15: $- 90.1 \pm 5.2 \%$, $p < 0,001$; D21: $- 88.1 \pm 8.3 \%$, $p < 0.001$) and of the nerve injury marker ATF3 (D15: $- 92.4 \pm 7.3 \%$, $p < 0.001$; D21: $- 89,0 \pm 5,3 \%$, $p < 0,01$) was strongly reduced in rats injected with LV-SOCS3t as compared to their sham-injected CCI controls (Fig. 6B). On the other hand, CCI-evoked enhanced concentrations of iNOS mRNA ($p > 0.05$, $n = 4$; Fig. 6B) or of the microglia activation marker ITGAM mRNA (data not shown) was not modified by the LV-SOCS3t administration at any time point studied and remained comparable to those measured in sham-injected CCI rats.

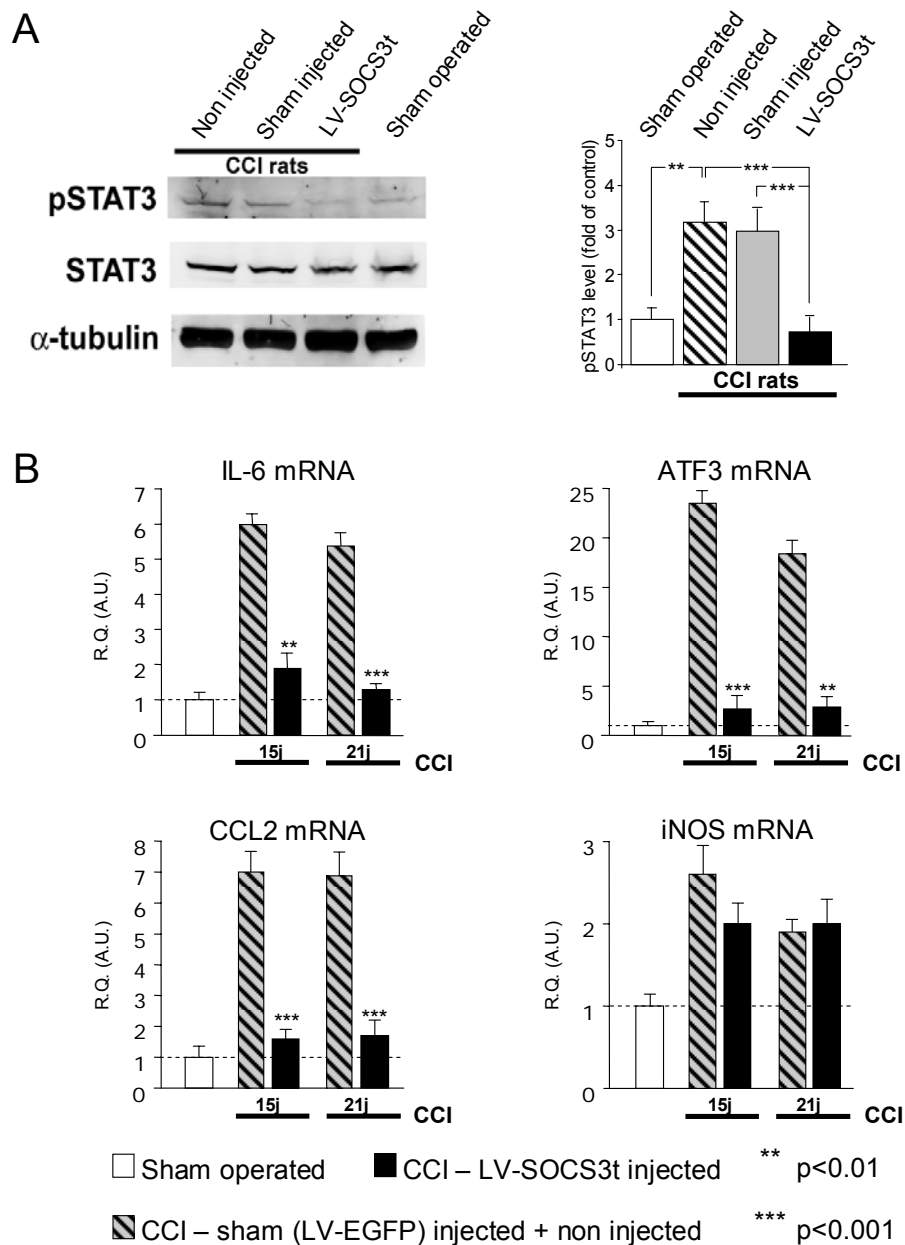


Figure 6: Impact of LV-SOCS3t spinal cord delivery on CCI-induced activation of the JAK/STAT3 pathway and its downstream signalling. **A/** Western blot experiments were performed using pSTAT3 (tyr705) and STAT3 specific antibodies on total proteins extracted from dorsal horn of naïve or CCI rats (control, LV-EFEGP-injected, LV-SOCS3t-injected) 2 days after CCI surgery. Blots are representative of three independent experiments performed with distinct set of animals from each experimental group (n = 3 per time point). Relative density of pSTAT3 labeling was normalized to individual relative densities of STAT3-IR within the same blot and is presented in relation to control (basal) condition in naïve rat (*right panel*). Alpha-tubulin was used as a loading control. Data represent mean \pm SEM. n = 3. **B/** Fifteen and 21 days after CCI, total RNA extracted from ipsilateral dorsal spinal cord of different experimental groups of rat were subjected to real-time semiquantitative RT-PCR experiments with specific primers for IL-6, ATF3, CCL2, iNOS or ITGAM. Data represent mean \pm SEM. n = 4-6 for each group, ** p<0.01, *** p<0.001 versus CCI-sham injected. R.Q. Relative quantification, A.U.: arbitrary unit.

DISCUSSION

In the present study, we have demonstrated that the activity of JAK/STAT3 signal transduction pathway is rapidly induced in the spinal cord, mainly in microglial cells, in response to the injury of peripheral nerve (CCI). Spinal cord JAK/STAT3 function was efficiently blocked by the physiological SOCS3 inhibitory protein, locally expressed from lentiviral vectors (LV). Transgenic SOCS3 overexpression hampered JAK/STAT3 downstream signaling responses, and, in particular, thwarted the abnormal expression of inflammatory mediators IL-6, CCL2 (MCP-1) and of nerve injury marker ATF3, strongly upregulated in the spinal cord of CCI rats. Furthermore, this targeted, mainly glia oriented, blockade of JAK/STAT3 signaling markedly attenuated the development of mechanical allodynia after CCI. These data thus suggest that in the spinal cord the activity of JAK/STAT3 transduction pathway may be an important link in spinal cord inflammatory signaling that participates in the development of neuroinflammatory condition and pain hypersensitivity after peripheral nerve lesion.

JAK/STAT3 signaling pathway, activated by numerous molecules, including cytokines and growth factors, is implicated in several inflammatory pathologies as rheumatoid arthritis (Shouda et al., 2001; Walker and Smith, 2005), inflammatory bowel disease (Sugimoto, 2008) or toxic choc (Jo et al., 2005). In response to local inflammatory reaction, this signaling pathway is also activated in damaged peripheral nerves, participating to nerve survival / regeneration process (Qiu et al., 2005; Miao et al., 2006; for review see Dziennis and Alkayed, 2008) and peripheral nerve sensitization (Moalem and Tracey, 2006). Injury of central nervous system is also associated with JAK/STAT3-mediated signaling that plays an important role in microglia inflammatory response (Kim et al., 2002) and in reactive astrogliosis (Yamauchi et al., 2006; Herrmann et al., 2008).

It is well documented today that injury of peripheral nerve leads to the development of important inflammatory reaction in the spinal cord, associated with glial cells activation and involving many inflammatory signaling molecules (Winkelstein et al., 2001; Suter et al., 2007). This neuroinflammatory condition in the spinal cord takes an important part in induction and maintaining of pathological pain that frequently appears after peripheral nerve lesion (Suter et al., 2007). In this context, we have recently demonstrated that spinal nerve ligation (SNL, a classical model of neuropathic pain) leads to a local activation of JAK/STAT3 pathway mostly in the microglia within the ipsilateral dorsal horn of the spinal cord and that IL-6 signaling is involved in the early phase of STAT3 activation (Dominguez

et al., 2008). Similar pattern of JAK/STAT3 activation, monitored through immunohistofluorescence (simple and double labeling) detection of accumulating phosphorylated (active) form of STAT3, was observed after sciatic nerve transection (SNT, unpublished data) and in the present study after CCI. The activation of JAK/STAT3 pathway in the spinal cord after peripheral nerve alteration was recently further confirmed by Lim et al. (2009), showing that after CCI, leptin and its receptors are upregulated in the ipsilateral spinal cord and that this adipocytokine signals through JAK/STAT3 pathway (Lim et al., 2009). In the spinal cord, these authors localized the enhanced levels of leptin receptors-IR mainly in neurons (NeuN-labeled) and to a lesser extent in astrocytes (GFAP-labeled). However, these authors did not identify the cell type(s) in the spinal cord in which pSTAT3-IR accumulated in response to CCI. In line with our data from SNL (Dominguez et al., 2008) or from SNT rats (unpublished data), 2d following CCI pSTAT3-IR was consistently co-localized with two distinct microglial markers ITGAM or Iba1 and very rarely or almost no with neuronal (NeuN) or astrocyte (GFAP) markers, respectively. As pSTAT3-IR levels in the spinal cord decreased at the later (1-2w) post-injury time points, we only performed these double-labeling immunohistofluorescence experiments 2d after CCI. We thus cannot exclude that in the later phases of spinal cord inflammatory process induced by CCI, JAK/STAT3 pathway could be also activated in other cell type(s).

Our previous data from experiments using intrathecally administered JAK2 tyrosine kinase inhibitor AG490 to block JAK/STAT3 activity supported the idea that in the spinal cord this system participates in the induction of pain after peripheral nerve lesion (Dominguez et al., 2008). Intrathecal co-delivery of AG490 and leptin was also demonstrated to reduce certain aspects of the leptin-induced pain hypersensitivity, further suggesting that JAK/STAT3 participates in pain behavior (Lim et al., 2009). However, although AG490 was used in several studies to inhibit JAK2/STAT3 pathway (Liu and Snider, 2001; Qiu et al., 2005), this drug is only partially selective toward JAK2 kinase. Moreover, accumulating data suggest that an important part of intrathecally delivered molecules may also diffuse to dorsal root ganglia and exert there their biochemical effects (Ji et al., 2002; Obata et al., 2004; Zhuang et al., 2006). We thus reasoned that local and selective blockade of JAK/STAT3 activity in the spinal cord should be necessary to assess the role of JAK/STAT3 transduction system in inflammatory signaling in the spinal cord and pain hypersensitivity associated with peripheral nerve damage. The SOCS family of inducible proteins has been identified as crucial negative regulators of pathways triggering cytokine signaling (for reviews see Wang and Campbell, 2002; O'Shea and Murray, 2008). In particular, SOCS3, which expression is directly induced

by IL-6 family of cytokines through JAK/STAT3 pathway, may, in turn, inhibit this signal transduction pathway. SOCS3 inhibitory potency of JAK/STAT3 downstream signaling is mediated through its interaction with both the specific receptors (leptin, insulin, erythropoietin, growth hormone) and the shared gp130 subunit (Croker et al., 2008; Dimitriou et al., 2008). Moreover, overexpression of SOCS3 has beneficial anti-inflammatory effects in several animal models of immune system-related pathologies such as rheumatoid arthritis (Shouda et al., 2001), toxic choc (Jo et al., 2005) or diabetes mellitus (Ronn et al., 2008).

We recently described an approach, using pseudotyped lentiviral vectors (LV), enabling efficient and highly restricted production of transgenes preferentially in glial cells of the rat dorsal spinal cord (Meunier et al., 2007; Meunier et al., 2008). We engineered LV vectors bearing tagged rat SOCS3 which microinjection into the rat dorsal horn of the spinal cord led to a robust and long-term (up to 6 month) overexpression of recombinant SOCS3. In CCI rats, this transgene-derived SOCS3 production resulted in almost complete inhibition of the accumulation of pSTAT3-IR, i.e. the activity of JAK/STAT3 transduction pathway, in the dorsal spinal cord.

Injury of peripheral nerve is associated with enhanced production and release of inflammatory-signaling molecules, including cytokines and chemokines, in the spinal cord where they contribute to nociceptive processing (for review, see Marchand et al., 2005; Scholz and Woolf, 2007). In agreement with previous studies (Latrémolière et al., 2008; Lee et al., 2008) CCI injury of the sciatic nerve was associated with an important upregulation of IL-6 mRNA in the spinal cord. IL-6 may be produced by both spinal cord neurons and activated microglial cell (Arruda et al., 1998; Milligan et al., 2000), and the nerve-injury induced IL-6 upregulation may be inhibited through a selective blockade of NF- κ B transcription factor in the spinal cord (Meunier et al., 2007). This NF- κ B-mediated transcription control of IL-6 seems, at least in part, triggered by the tumor necrosis factor receptor 1 stimulation (Lee et al., 2008). JAK/STAT3 transduction system is a principal signaling pathway of IL-6 (and related cytokines) through which IL-6 may regulate expression of numerous products including its own production (for review, see O'Shea and Murray, 2008). Interestingly, the transgenic SOCS3t-mediated preventive blockade of JAK/STAT3 signaling strongly reduced the CCI-induced accumulation of IL-6 mRNA in the spinal cord. This observation thus suggests that, at least in the early phase of cytokine signaling evoked by CCI, JAK/STAT3 plays a major role in the regulation of IL-6 expression in the spinal cord. Enhanced expression of the "neuronal injury marker" ATF3 was also recently reported in the rat dorsal spinal cord after CCI of the sciatic nerve and direct relation

between enhanced levels of IL-6 and upregulated ATF3 was suggested (Latrémolière et al., 2008). IL-6 stimulated microglia, involving STAT3 intracellular signaling, exerts clearly harmful effects on nerve survival (Kradly et al., 2008). Blockade of IL-6 signaling accompanied by strongly reduced expression of IL-6 in the spinal cord may thus support our observation that in LV-SOCS3t treated rats, CCI-induced only modest increase of ATF3 expression. This finding thus strengthens the relationship between IL-6 and ATF3 in the spinal cord and of the detrimental effect of IL-6 signaling in the spinal cord. The CCL2 chemokine (also called MCP-1) is another signaling molecule identified as an important actor of neuron-microglia communication (Biber et al., 2008) that contributes directly to the maintenance of pain, especially following injury of peripheral nerves (for review, see Abbadie, 2005; White et al., 2005). Expression of CCL2 is upregulated in both DRG and spinal cord after peripheral nerve injury (Zhang and De Koninck, 2006; Thacker et al., 2009) and may be regulated through NF- κ B (Ping et al., 1999) and STAT3 (Kim et al., 2002) transcription factors. Similarly to the IL-6 and the closely related ATF3 production in the spinal cord, preventive blockade of JAK/STAT3 activation and of its downstream signaling seems however sufficient to reduce the nerve injury evoked increase of CCL2 expression. Although, as suggested by Thacker et al. (2009), intrinsic CCL2 mRNA increase in the spinal cord in response to peripheral nerve injury could be attributed to mRNA transport from dorsal root ganglia to spinal cord, our present results rather suggest expression of MCP-1 in cells intrinsic to the spinal cord. Expression pattern of CCL2 in LV-SOCS3t-injected or control CCI rats revealed also some congruence with the modulation of IL-6 and ATF3 expression, thus further suggesting locally expressed MCP-1. In addition, we previously observed that intrathecal injection of IL-6 is sufficient to induce expression of ATF3 (Latrémolière et al., 2008) and CCL2 (unpublished data) in naïve rats, thus globally supporting the idea that in the spinal cord JAK/STAT3-mediated signaling may modulate the CCL2 expression. Inhibition of JAK/STAT3 signal transduction pathway did not affect the CCI-associated enhanced levels of iNOS mRNA. This finding is coherent with many data showing that other inflammatory cytokines, IL-1 β and TNF α , play an important role, mainly through the NF- κ B transduction pathway, in the regulation of iNOS expression (for review, see Saha and Pahan, 2006; Sung et al., 2004; Meunier et al., 2007).

Neuropathic pain is associated with early microglial activation in the spinal cord (Echeverry et al., 2007; Suter et al., 2007). In three different models of peripheral nerve injury (previous and present studies), we have demonstrated that JAK/STAT3 activation occurs almost exclusively in activated microglia 48h after injury. However, early blockade of JAK/STAT3

signaling, using either intrathecally administered AG490 in SNL rats (Dominguez et al., 2008), or a local and highly selective approach in the present study, had no effect on enhanced ITGAM expression observed after peripheral nerve damage. Considering ITGAM expression (mRNA and protein) as usual indicator of microglial activation (Blackbeard et al., 2007), these observations suggest that JAK/STAT3 pathway activity has no major role on microglial activation. Despite the lack of effect on ITGAM expression, JAK/STAT3 participates in other microglial function and, in particular this signaling pathway mediates, at least *in vitro*, gangliosides-induced inflammatory effects (Kim et al., 2002). These data are consistent with our *in vitro* results from BV2 mouse microglia cell line which incubation with IL-6 induces expression of several proinflammatory markers that may be reduced in LV-SOCS3t infected cells (not shown). However, *in vivo* situation after nerve lesion is associated with a complex pattern of signaling and phenotypic changes, and, besides IL-6, numerous other molecules, signaling through various pathways, have been clearly demonstrated to trigger the spinal cord glial activation (for review, see Scholz and Woolf, 2007).

LV-SOCS3t-mediated inhibition of JAK/STAT3 activity and of its downstream responses (reduced expression of IL-6, ATF3 and CCL2) in the spinal cord markedly reduced the mechanical hypersensitivity that develops after CCI of sciatic nerve. After our first demonstration that JAK/STAT3 is activated in the spinal cord in response to peripheral nerve damage, we suggested that this signaling pathway participates in associated pain (Dominguez et al., 2008). Lim and colleagues recently extended our data showing that leptin, another cytokine classically using JAK/STAT3 transduction system, is upregulated together with its receptor in the spinal cord of CCI rats and that the pronociceptive effect of leptin is mainly mediated through JAK/STAT3 signaling pathway. In our present study, preventive blockade of JAK/STAT3 activity achieved using a local, and mainly glia-oriented production of a specific physiological protein SOCS3 markedly attenuated the development of mechanical pain hypersensitivity associated with CCI of sciatic nerve. The reduced pain hypersensitivity remained constant during the three weeks observation period and paralleled, on the one hand, the strongly enhanced expression of transgenic SOCS3 and, on the other hand, the reduced concentration of IL-6 and CCL2 mRNA in the spinal cord, thus supporting direct implication of SOCS3 in the observed antiallodynic effect. In this study we used a preventive blockade of JAK/STAT3 activity. Further experiments are needed to evaluate the possible therapeutic intervention, using targeted SOCS3 production, on already well-established neuropathic pain. As previously documented, the experimental procedure of LV microinjection resulted in closely restricted production of transgene product within the dorsal horn of the spinal

(Meunier et al., 2007; 2008). Hence, both biochemical and behavioral effects arising from spinal cord SOCS3 overproduction reflects local, spinal cord blockade of JAK/STAT3 rather than an altered activity of this signaling pathway in lesioned peripheral nerve and reveals thus the importance of this signal transduction pathway in inflammatory signaling in the spinal cord and in the development of mechanical pain hypersensitivity.

REFERENCES

- Abbadie C (2005) Chemokines, chemokine receptors and pain. *Trends Immunol* 26:529-534.
- Alexander WS (2002) Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2:410-416.
- Arruda JL, Colburn RW, Rickman AJ, Rutkowski MD, DeLeo JA (1998) Increase of interleukin-6 mRNA in the spinal cord following peripheral nerve injury in the rat: potential role of IL-6 in neuropathic pain. *Brain Res Mol Brain Res* 62:228-235.
- Auernhammer CJ, Bousquet C, Melmed S (1999) Autoregulation of pituitary corticotroph SOCS-3 expression: characterization of the murine SOCS-3 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6964-6969.
- Bennett GJ, Xie YK (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33:87-107.
- Biber K, Vinet J, Boddeke HW (2008) Neuron-microglia signaling: chemokines as versatile messengers. *J Neuroimmunol* 198:69-74.
- Blackbeard J, O'Dea KP, Wallace VC, Segerdahl A, Pheby T, Takata M, Field MJ, Rice AS (2007) Quantification of the rat spinal microglial response to peripheral nerve injury as revealed by immunohistochemical image analysis and flow cytometry. *J Neurosci Methods* 164:207-217.
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53:55-63.
- Crocker BA, Kiu H, Nicholson SE (2008) SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol* 19:414-422.
- Dimitriou ID, Clemenza L, Scotter AJ, Chen G, Guerra FM, Rottapel R (2008) Putting out the fire: coordinated suppression of the innate and adaptive immune systems by SOCS1 and SOCS3 proteins. *Immunol Rev* 224:265-283.
- Dixon WJ. (1980) Efficient analysis of experimental observations, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 20, 441-462.
- Dominguez E, Rivat C, Pommier B, Mauborgne A, Pohl M (2008) JAK/STAT3 pathway is activated in spinal cord microglia after peripheral nerve injury and contributes to neuropathic pain development in rat. *J Neurochem* 107:50-60.
- Dziennis S, Alkayed NJ (2008) Role of signal transducer and activator of transcription 3 in neuronal survival and regeneration. *Rev Neurosci* 19:341-361.
- Echeverry S, Shi XQ, Zhang J (2007) Characterization of cell proliferation in rat spinal cord following peripheral nerve injury and the relationship with neuropathic pain. *Pain*.

- Gatto L, Berlato C, Poli V, Tininini S, Kinjyo I, Yoshimura A, Cassatella MA, Bazzoni F (2004) Analysis of SOCS-3 promoter responses to interferon gamma. *J Biol Chem* 279:13746-13754.
- Goslin K, Asmussen H, Banker G (1998) Rat hippocampal neurons in low-density culture. In: *Culturing Nerve Cells* (Banker G, Goslin K, eds), pp 339-370: MIT Press.
- Herrmann JE, Imura T, Song B, Qi J, Ao Y, Nguyen TK, Korsak RA, Takeda K, Akira S, Sofroniew MV (2008) STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J Neurosci* 28:7231-7243.
- Ji GC, Zhang YQ, Ma F, Wu GC (2002) Increase of nociceptive threshold induced by intrathecal injection of interleukin-1beta in normal and carrageenan inflammatory rat. *Cytokine* 19:31-36.
- Jo D, Liu D, Yao S, Collins RD, Hawiger J (2005) Intracellular protein therapy with SOCS3 inhibits inflammation and apoptosis. *Nat Med* 11:892-898.
- Kim OS, Park EJ, Joe EH, Jou I (2002) JAK-STAT signaling mediates gangliosides-induced inflammatory responses in brain microglial cells. *J Biol Chem* 277:40594-40601.
- Krady JK, Lin HW, Liberto CM, Basu A, Kremlev SG, Levison SW (2008) Ciliary neurotrophic factor and interleukin-6 differentially activate microglia. *J Neurosci Res* 86:1538-1547.
- Latremoliere A, Mauborgne A, Masson J, Bourgoin S, Kayser V, Hamon M, Pohl M (2008) Differential implication of proinflammatory cytokine interleukin-6 in the development of cephalic versus extracephalic neuropathic pain in rats. *J Neurosci* 28:8489-8501.
- Lee KM, Jeon SM, Cho HJ (2008) Tumor necrosis factor receptor 1 induces interleukin-6 upregulation through NF-kappaB in a rat neuropathic pain model. *Eur J Pain*.
- Lim G, Wang S, Zhang Y, Tian Y, Mao J (2009) Spinal leptin contributes to the pathogenesis of neuropathic pain in rodents. *J Clin Invest*.
- Liu RY and Snider WD (2001) Different Signaling Pathways Mediate Regenerative versus Developmental Sensory Axon Growth. *J Neurosci* 21: 164
- Marchand F, Perretti M, McMahon SB (2005) Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 6:521-532.
- Meunier A, Mauborgne A, Masson J, Mallet J, Pohl M (2008) Lentiviral-mediated targeted transgene expression in dorsal spinal cord glia: Tool for the study of glial cell implication in mechanisms underlying chronic pain development. *J Neurosci Methods* 167:148-159.
- Meunier A, Latremoliere A, Dominguez E, Mauborgne A, Philippe S, Hamon M, Mallet J, Benoliel JJ, Pohl M (2007) Lentiviral-mediated targeted NF-kappaB blockade in dorsal spinal cord glia attenuates sciatic nerve injury-induced neuropathic pain in the rat. *Mol Ther* 15:687-697.
- Miao T, Wu D, Zhang Y, Bo X, Subang MC, Wang P, Richardson PM (2006) Suppressor of cytokine signaling-3 suppresses the ability of activated signal transducer and activator of transcription-3 to stimulate neurite growth in rat primary sensory neurons. *J Neurosci* 26:9512-9519.
- Milligan ED, Mehmert KK, Hinde JL, Harvey LO, Martin D, Tracey KJ, Maier SF, Watkins LR (2000) Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intrathecal

- administration of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp120. *Brain Res* 861:105-116.
- Moalem G, Tracey DJ (2006) Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res Rev* 51:240-264.
- Nicholson SE, De Souza D, Fabri LJ, Corbin J, Willson TA, Zhang JG, Silva A, Asimakis M, Farley A, Nash AD, Metcalf D, Hilton DJ, Nicola NA, Baca M (2000) Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6493-6498.
- Obata K, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Mizushima T, Katsura H, Fukuoka T, Tokunaga A, Noguchi K (2004) Role of mitogen-activated protein kinase activation in injured and intact primary afferent neurons for mechanical and heat hypersensitivity after spinal nerve ligation. *J Neurosci* 24:10211-10222.
- O'Shea JJ, Murray PJ (2008) Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* 28:477-487.
- Ping D, Boekhoudt GH, Rogers EM, Boss JM (1999) Nuclear factor-kappa B p65 mediates the assembly and activation of the TNF-responsive element of the murine monocyte chemoattractant-1 gene. *J Immunol* 162:727-734.
- Qiu J, Cafferty WB, McMahon SB, Thompson SW (2005) Conditioning injury-induced spinal axon regeneration requires signal transducer and activator of transcription 3 activation. *J Neurosci* 25:1645-1653.
- Ronn SG, Borjesson A, Bruun C, Heding PE, Frobose H, Mandrup-Poulsen T, Karlsen AE, Rasschaert J, Sandler S, Billestrup N (2008) Suppressor of cytokine signalling-3 expression inhibits cytokine-mediated destruction of primary mouse and rat pancreatic islets and delays allograft rejection. *Diabetologia* 51:1873-1882.
- Saha RN, Pahan K (2006) Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxid Redox Signal* 8:929-947.
- Scholz J, Woolf CJ (2007) The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci* 10:1361-1368.
- Sheu JY, Kulhanek DJ, Eckenstein FP (2000) Differential patterns of ERK and STAT3 phosphorylation after sciatic nerve transection in the rat. *Exp Neurol* 166:392-402.
- Shouda T, Yoshida T, Hanada T, Wakioka T, Oishi M, Miyoshi K, Komiya S, Kosai K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Nagata K, Yoshimura A (2001) Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 108:1781-1788.
- Sugimoto K (2008) Role of STAT3 in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 14:5110-5114.
- Sung CS, Wen ZH, Chang WK, Ho ST, Tsai SK, Chang YC, Wong CS (2004) Intrathecal interleukin-1beta administration induces thermal hyperalgesia by activating inducible nitric oxide synthase expression in the rat spinal cord. *Brain Res* 1015:145-153.
- Suter MR, Wen YR, Decosterd I, Ji RR (2007) Do glial cells control pain? *Neuron Glia Biol* 3:255-268.
- Thacker MA, Clark AK, Bishop T, Grist J, Yip PK, Moon LD, Thompson SW, Marchand F, McMahon SB (2008) CCL2 is a key mediator of microglia activation in neuropathic pain states. *Eur J Pain*.

- Walker JG, Smith MD (2005) The Jak-STAT pathway in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 32:1650-1653.
- Winkelstein BA, Rutkowski MD, Sweitzer SM, Pahl JL, DeLeo JA (2001) Nerve injury proximal or distal to the DRG induces similar spinal glial activation and selective cytokine expression but differential behavioral responses to pharmacologic treatment. *J Comp Neurol* 439:127-139.
- Yamauchi K, Osuka K, Takayasu M, Usuda N, Nakazawa A, Nakahara N, Yoshida M, Aoshima C, Hara M, Yoshida J (2006) Activation of JAK/STAT signalling in neurons following spinal cord injury in mice. *J Neurochem* 96:1060-1070.
- Wang J, Campbell IL (2002) Cytokine signaling in the brain: putting a SOCS in it? *J Neurosci Res* 67:423-427.
- White FA, Bhangoo SK, Miller RJ (2005) Chemokines: integrators of pain and inflammation. *Nat Rev Drug Discov* 4:834-844.
- Zennou V, Serguera C, Sarkis C, Colin P, Perret E, Mallet J, Charneau P (2001) The HIV-1 DNA flap stimulates HIV vector-mediated cell transduction in the brain. *Nat Biotechnol* 19:446-450.
- Zhang J, De Koninck Y (2006) Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury. *J Neurochem* 97:772-783.
- Zhuang ZY, Wen YR, Zhang DR, Borsello T, Bonny C, Strichartz GR, Decosterd I, Ji RR (2006) A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. *J Neurosci* 26:3551-3560.
- Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D (1997) Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 15:871-875.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Notre travail a permis de montrer que l'altération d'un nerf périphérique conduisait à l'activation de la voie JAK/STAT3 dans la moelle épinière, en particulier au sein des cellules microgliales. Son activité spinale, évoquée notamment par l'IL-6, participe au développement des douleurs chroniques neuropathiques associées à la lésion du nerf périphérique.

Au moment du bilan, nous devons nous interroger sur la pertinence des modèles animaux de douleurs neuropathiques et des approches expérimentales que nous avons choisies pour atteindre les objectifs de cette étude.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'activité de la voie JAK/STAT3 à l'étage spinal. Cependant, il faut souligner que le système JAK/STAT3 peut être activé également dans le nerf périphérique et y participer à la réponse post-lésionnelle de la cellule. L'activation de cette voie peut par ailleurs être observée en réaction à la lésion traumatique de la moelle épinière elle-même. À tous ces niveaux, la voie JAK/STAT3 participe aux différents mécanismes de réparation après lésion et son rôle dans la douleur pathologique demeure, en grande partie, inconnu.

La lésion de nerf périphérique provoque des altérations des neurones mais également des cellules gliales dans la moelle épinière et peut conduire au développement de douleurs chroniques. À ce niveau, la lésion induit la libération de médiateurs algogènes dont fait partie l'IL-6. L'objectif du présent travail de thèse était de montrer si la voie de signalisation majeure de l'IL-6, JAK/STAT3, était mise en jeu dans la moelle épinière à la suite d'une lésion de nerf périphérique. Si tel était le cas, nous voulions préciser le(s) type(s) cellulaire(s) concerné(s), le décours temporel de son activation, puis vérifier sa contribution éventuelle aux principaux phénomènes de plasticité dans la moelle épinière qui résultent de la lésion de nerf périphérique.

Après avoir discuté de la pertinence des modèles animaux et des méthodes utilisés pour atteindre ces objectifs, nous montrerons que la voie JAK/STAT3 peut être activée à d'autres niveaux et dans différentes catégories cellulaires en réponse à une lésion tissulaire.

1 Pertinence de la méthode utilisée

Afin d'étudier l'implication de la voie de signalisation JAK/STAT3 spinale dans le développement des douleurs chroniques neuropathiques, nous avons réalisé notre travail dans différents modèles de ces douleurs évoquées par des lésions de nerfs périphériques chez le rat. Bien entendu, au vu des résultats obtenus, il est nécessaire de poser la question du choix des modèles animaux utilisés.

Nous avons également au cours de cette étude procédé à l'inhibition ciblée de la voie JAK/STAT3 spinale à l'aide de l'injection intraparenchymale du vecteur viral surproduisant

la protéine SOCS3. De la même manière, il apparaît important de se demander si l'utilisation de ce type de vecteur et de la technique délicate d'injection directe dans la corne dorsale de la moelle épinière a été la plus judicieuse.

1.1 Les modèles animaux de douleurs neuropathiques

Dans le cas des modèles animaux expérimentaux, tels qu'utilisés en recherche fondamentale, la définition de modèle est différente du premier sens « ce qui sert de référence ou est imité ». Dans la majeure partie des modèles animaux de pathologies humaines, le modèle n'est qu'une représentation d'une affection : dans notre cas, de la douleur chronique neuropathique qui se développe après lésion de nerf périphérique. Le plus souvent, un modèle ne permet d'aborder que certains aspects de la pathologie étudiée. Il s'avère ainsi nécessaire de développer plusieurs modèles, d'intérêt complémentaire, pour approcher et tenter de comprendre au mieux l'ensemble des mécanismes physiopathologiques impliqués.

Bien qu'ils ne satisfassent pas à tous les critères de validation d'un modèle (mimer en tous points les signes cliniques de la pathologie chez l'Homme et permettre d'accéder à tous les paramètres pertinents au regard de la pathologie étudiée), les modèles animaux de douleurs neuropathiques sont néanmoins indispensables à l'investigation des mécanismes sous-tendant l'induction et/ou le maintien de la douleur et à la vérification de leur pertinence comme nouvelles cibles thérapeutiques. Dans certaines conditions, ces modèles peuvent être prédictifs et présentent un intérêt évident pour les études précliniques.

Après avoir insisté sur les règles d'éthique à respecter lors de l'expérimentation animale, nous exposerons les différents modèles de douleurs neuropathiques utilisés chez le rat puis discuterons de la pertinence de ces modèles animaux par rapport aux pathologies observées chez l'Homme. Enfin, nous verrons comment nous avons tenu compte de l'ensemble de ces contraintes dans notre étude.

1.1.1 Les recommandations éthiques

L'expérimentation chez l'animal ne doit être utilisée que dans le cas où les méthodes alternatives (culture cellulaire, modélisation par ordinateur,...) ne sont plus suffisantes pour prendre en compte l'ensemble des paramètres intervenant chez un être pluricellulaire. Bien que l'expérimentation chez l'animal permette de comprendre et d'élaborer des traitements pour de grandes pathologies, cette utilisation ne doit pas se faire en assimilant l'animal à un

outil. L'animal est un être sensible, capable de souffrir et de se souvenir, qui doit être respecté.

De plus, si l'animal est dans un état déplorable ou qu'il est dans un état de stress tel que les réactions neurovégétatives sont exacerbées, il apparaît clairement que les observations scientifiques ne seront pas validées du point de vue physiologique (Le Bars et al., 2001). Ainsi, c'est non seulement pour des raisons morales mais également scientifiques que certaines règles doivent être respectées.

Travaillant dans le domaine de la douleur, il est d'autant plus capital de s'assurer du respect de ces règles. Le comité d'éthique de l'IASP a, de ce fait, formulé quelques directives à suivre pour l'expérimentation animale dans le domaine de la douleur (Tableau 8).

Dans le cadre des modèles de douleurs neuropathiques, il est relativement difficile de satisfaire à l'ensemble de ces conseils étant donné les différents modèles existants et leurs limites.

1.1.2 Les différents modèles animaux de douleurs neuropathiques

C'est en 1974 que Wall et Gutnik ont constaté que les mécanismes de transduction de la douleur n'étaient pas les mêmes chez le rat sain que chez le rat ayant subi une lésion nerveuse (Wall and Gutnick, 1974). Les premiers modèles de douleurs aberrantes sont alors apparus. Ils ont dans un premier temps consisté en une lésion complète du nerf sciatique (SNT, *Sciatic Nerve Transection* ; Wall et al., 1979). Bien que les auteurs aient attribué la forte autotomie (autophagie de la patte atteinte) à une augmentation de la douleur spontanée (voir 1.1.4), ce modèle s'avère difficile à étudier sur le plan de la douleur évoquée (Kauppila and Xu, 1996).

Dans les années qui suivirent, d'autres modèles impliquant des lésions partielles de nerfs sont apparus. Tout d'abord, toujours au niveau du nerf sciatique, Bennett et Xie ont expérimenté l'utilisation de 4 ligatures de nature particulière (CCI, *Chronic Constriction Injury* ; Bennett and Xie, 1988). En effet, les ligatures posées sont lâches dans la mesure où elles assurent une constriction du nerf sans interrompre la circulation épineurienne. Cette procédure provoque la formation d'un œdème qui accentue la constriction générant une ischémie partielle et une inflammation locale. Le matériau utilisé pour réaliser ces ligatures, le *chromic catgut*, est également déterminant pour observer tous les phénomènes qui se mettent en place dans ce modèle (Maves et al., 1993). On provoque ainsi une lésion axonale en absence d'axotomie. Une telle atteinte du nerf est comparable à celle retrouvée chez les patients après compression tissulaire suite à un traumatisme ou le développement de tumeurs.

Ethical Guidelines for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals

The Committee for Research and Ethical Issues of the International Association for the Study of Pain (IASP®) is concerned with the ethical aspects of studies producing experimental pain and any suffering it may cause in animals. Such studies are essential if new and clinically relevant knowledge about the mechanisms of pain is to be acquired. Investigations in conscious animals intended to stimulate chronic pain in man are being performed. Such experiments require careful planning to avoid or at least minimize pain in the animals.

Investigators of animals models for chronic pain, as well as those applying acute painful stimuli to animals, should be aware of the problems pertinent to such studies and should make every effort to minimize pain. They should accept a general attitude in which the animal is regarded not as an object for exploitation, but as a living individual.

In practice, investigators engaged in research on pain in animals should consider the following guidelines aimed at minimizing pain in animals and, when submitting a manuscript, state explicitly that they have been followed. The guidelines are concerned with the importance of the investigation, the severity and the duration of the pain.

1. It is essential that the intended experiments on pain in conscious animals be reviewed beforehand by scientists and lay-persons. The potential benefit of such experiments to our understanding of pain mechanisms and pain therapy needs to be shown. The investigator should be aware of the ethical need for a continuing justification of his investigations.
2. If possible, the investigator should try the pain stimulus on himself; this principle applies for most non-invasive stimuli causing acute pain.
3. To make possible the evaluation of the levels of pain, the investigator should give a careful assessment of the animal's deviation from normal behavior. To this end, physiological and behavioral parameters should be measured. The outcome of this assessment should be included in the manuscript.
4. In studies of acute or chronic pain in animals measures should be taken to provide a reasonable assurance that the animal is exposed to the minimal pain necessary for the purposes of the experiment.
5. An animal presumably experiencing chronic pain should be treated for relief of pain, or should be allowed to self-administer analgesic agents or procedures, as long as this will not interfere with the aim of the investigation.
6. Studies of pain in animals paralyzed with a neuromuscular blocking agent should not be performed without a general anesthetic or an appropriate surgical procedure that eliminates sensory awareness.
7. The duration of the experiment must be as short as possible and the number of animals involved kept to a minimum.

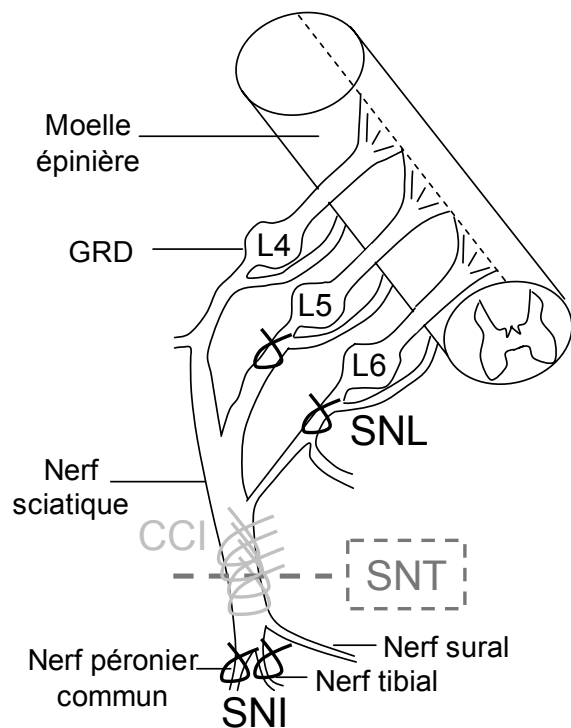
Tableau 8 : Les recommandations éthiques formulées par l'IASP pour l'expérimentation animale dans le domaine de la douleur.
<http://www.iasp-pain.org/>

En 1992, Kim et Chung proposèrent un autre modèle s'intéressant cette fois aux nerfs spinaux qui projettent du nerf sciatique vers la moelle épinière (SNL, *Spinal Nerve Ligation*, Kim and Chung, 1992). Afin de s'affranchir de la composante motrice provenant majoritairement de L4, les ligatures serrées sont posées sur les nerfs spinaux L5 et L6. Bien que nécessitant une chirurgie plus invasive, ce modèle s'avère plus robuste (amplitude et durée de l'hypersensibilité douloureuse supérieures) que le CCI.

Enfin, en 2000, Decosterd et Woolf présentèrent un nouveau modèle de lésion partielle de nerf périphérique (SNI, *Spared Nerve Injury*, Decosterd and Woolf, 2000). La région concernée se situe cette fois-ci au niveau des branches terminales du nerf sciatique. Les nerfs péronier et tibial sont ligaturés et sectionnés dans la partie distale à la ligature. Le troisième segment périphérique du nerf sciatique, le nerf sural, est laissé intact. Cette procédure permet de réaliser les tests nociceptifs sur le territoire non lésé à côté des aires dénervées. Ce modèle s'avère également reproduire la plupart des signes observés en clinique.

Les 3 modèles que nous venons d'exposer sont les plus utilisés dans la recherche sur les douleurs neuropathiques chez l'animal (Figure 16). Néanmoins, il est important de noter que d'autres modèles existent qui consistent le plus souvent en une modification de ceux abordés. Par exemple, la ligature d'une seule racine dorsale L5 provoque également l'apparition de phénomènes liés au développement de la douleur neuropathique. Sur le nerf sciatique, la lésion d'une partie des fibres (Seltzer et al., 1990) ou la compression du nerf induite par un court manchon de polyéthylène (Mosconi and Kruger, 1996) sont aussi utilisés par certaines équipes comme modèle de douleur neuropathique.

Par ailleurs, même pour un modèle particulier dont la chirurgie est pratiquée par le même expérimentateur et dans des conditions identiques, il faut être conscient que différents facteurs peuvent affecter le développement de la douleur neuropathique. Ces facteurs peuvent être internes, relatifs à l'animal lui-même (souche, fournisseur, sexe, âge), et/ou externes. Les facteurs externes les plus déterminants sont les rythmes circadiens, l'influence des saisons, l'humidité de l'air, l'influence de l'ordre des tests, le régime alimentaire, les variables sociales, la stabulation et la manipulation, la densité de la cage, l'activité sexuelle, les facteurs de stress et bien-être, l'expérimentateur lui-même (Vissers et al., 2003). L'ensemble de ces paramètres est à prendre en compte lors de l'expérimentation car ils peuvent naturellement influencer les résultats obtenus.



CCI (Chronic Constriction Injury) :

4 ligatures lâches autour du nerf sciatique
Bennett & Xie, 1988

SNI (Spared Nerve Injury) :

2 ligatures serrées et sections distales des nerfs péronier et tibial.

Decosterd & Woolf, 2000

SNL (Spinal Nerve Ligation) :

2 ligatures serrées sur les nerfs spinaux L5 et L6

Kim & Chung, 1992

SNT (Sciatic nerve transection) :

Section complète du nerf sciatique entre 2 ligatures serrées

Wall et al., 1979

Figure 16 : Représentation schématique des principaux modèles de douleurs neuropathiques.

Enfin, les modèles développés jusqu'alors provoquent des modifications physiologiques et comportementales qui peuvent être différentes. Comme nous l'avons souligné pour le CCI et le SNL, ces modèles, d'un point de vue comportemental, induisent tous une allodynie et une hyperalgésie mais d'amplitude et de durée différente (Dowdall et al., 2005). D'autre part, certains des mécanismes moléculaires et cellulaires peuvent être également différents d'un modèle à l'autre (Colburn et al., 1999; Lee et al., 2009). La diversité de ces modèles et leur complémentarité permettent d'étudier différents paramètres qui peuvent être observés chez les patients douloureux chroniques.

1.1.3 Les relations entre les modèles animaux et les pathologies existantes chez l'Homme

Les modèles animaux s'avèrent utiles (et nécessaires) pour la compréhension de la physiopathologie de la douleur et ont une valeur prédictive avérée pour l'étude de nouveaux traitements. En effet, la valeur prédictive de 4 modèles de douleurs neuropathiques évaluée sur plus de 3000 études montre que la sensibilité pharmacologique de ces modèles est de l'ordre de 61 à 88 % (Kontinen and Meert, 2003). Par ailleurs, il existe une certaine congruence entre les données expérimentales chez l'animal et les données cliniques pour quelques composés comme les anti-dépresseurs, les anti-épileptiques et les anti-NMDA (Bouhassira, 2007). Toutefois, pour les anti-inflammatoires et les antagonistes du récepteur NK-1 qui donnent des résultats satisfaisants chez l'animal, les études cliniques ont montré que ces molécules n'étaient pas capables chez l'Homme de soulager la douleur de manière significative (Boyce and Hill, 2000).

D'autre part, les modèles animaux de douleurs neuropathiques ont permis de mettre en évidence un nombre important de mécanismes impliqués dans ces douleurs. Certains de ces concepts, comme les décharges ectopiques, ont été vérifié ensuite chez le patient douloureux chronique, même si, néanmoins, ces décharges peuvent être observées aussi bien dans le cas de neuropathies douloureuses que non douloureuses (Orstavik et al., 2006).

Comme nous l'avons décrit dans les rappels bibliographiques, il existe une co-morbidité bien établie entre douleur chronique et troubles anxio-dépressifs chez le patient. Dans les modèles animaux de douleur neuropathique, il existe également une relation entre douleur chronique et stress (Blackburn-Munro, 2004). Seul un certain nombre d'animaux, parmi ceux ayant subi la même chirurgie, développe des signes de dysfonctionnement physiologiques qui peuvent être

observés chez les patients : modifications des interactions sociales, du sommeil, du comportement sexuel, du gain de poids et de la prise de nourriture (Keay et al., 2004).

Les patients douloureux neuropathiques se plaignent le plus souvent de douleurs spontanées qui apparaissent sans stimulus (de type brûlure, piqûre, arrachement, ...) (Basbaum et al., 2006). Malgré cela, c'est la douleur évoquée (déclenchée par un stimulus) qui est le plus souvent étudiée chez l'animal, notamment parce qu'elle est plus facile à obtenir, peut être répétée et assez précisément quantifiée. L'étude de la douleur évoquée est, cependant, aussi importante car elle est présente chez 38% (hypersensibilité thermique) et 64% (hypersensibilité mécanique) des patients douloureux neuropathiques (Mogil and Crager, 2004).

L'étude de la douleur évoquée par un stimulus mécanique non douloureux, l'allodynie mécanique, est réalisée chez l'animal comme chez le patient à l'aide des filaments de Von Frey de calibres différents. L'utilisation de ces poils permet de mesurer l'allodynie en un point (allodynie statique). Pourtant, chez l'Homme, c'est surtout l'allodynie déclenchée par le frottement (d'un vêtement par exemple) qui est à prendre en compte (allodynie dynamique). Le diagnostic de douleur neuropathique repose d'ailleurs sur la réponse à ce type de stimulus, réalisé à l'aide d'une brosse souple ou d'un coton-tige (Blackburn-Munro, 2004). Le peu d'études qui ont pris en compte cette composante chez l'animal ont montré que certains composés étaient efficaces pour atténuer l'allodynie statique mais pas dynamique. Ces données suggèrent que ces deux aspects de l'allodynie mécanique reposeraient sur des mécanismes différents (Field et al., 1999a, 1999b).

1.1.4 La prise en compte de ces contraintes dans notre étude

Conscients de l'ensemble des problèmes liés à l'utilisation de modèles animaux, nous avons tenté de respecter au maximum les recommandations précédemment citées.

Tout d'abord, le travail sur les animaux s'est fait dans le respect de règles institutionnelles gouvernant l'utilisation des animaux en neurosciences et dans le domaine de la douleur. Ainsi, l'animal est traité avec respect et les interventions chirurgicales qu'il subit sont pratiquées sous anesthésie générale dans des conditions semi-stériles. L'état de l'animal (prise de poids, comportement général, présence d'infection ...) est vérifié et consigné tout au long de l'étude. Par conséquent, dans les modèles SNT et CCI pouvant induire une autotomie, l'animal peut être sacrifié si l'autotomie devient sévère.

Les questions posées dans cette étude nécessitaient le recours à l'expérimentation animale et l'utilisation d'un modèle de douleur neuropathique. Toutefois, nous avons préféré vérifier que l'activité de la voie JAK/STAT3 dans la moelle épinière est bien induite dans 3 modèles différents de lésion de nerf périphérique. Les 2 modèles validés de douleur neuropathiques (SNL et CCI) nous ont permis de conclure que cette voie participait effectivement au développement de l'hypersensibilité douloureuse après lésion de nerf. La diversité et, néanmoins, complémentarité de ces modèles laissent à penser que l'activation de cette voie de transduction est un facteur commun aux douleurs neuropathiques post-lésionnelles, du moins chez le rat. Bien que des données cliniques rapportent l'augmentation locale (peau et nerf) de certaines cytokines proinflammatoires, suggérant l'implication de ces molécules dans la physiopathologie de la douleur neuropathique, il nous semble actuellement difficile de spéculer sur la mise en jeu de ce système de signalisation chez le patient souffrant de douleurs neuropathiques associées à la lésion de nerf périphérique (Empl et al., 2001; Lindenlaub and Sommer, 2003; Salemi et al., 2003; Teles et al., 2007).

Au cours de cette étude, nous avons veillé, par ailleurs, à contrôler les différents facteurs susceptibles de modifier la reproductibilité des résultats. Les animaux étaient stabulés dans des conditions très strictes et les expériences comportementales étaient toujours réalisées en aveugle par l'expérimentateur auquel ils avaient été habitués auparavant.

Nous avons choisi d'évaluer le comportement douloureux des animaux à l'aide de tests de douleur évoquée. La mesure de la douleur spontanée chez l'animal, notamment dans les modèles s'appuyant sur des lésions de nerf périphérique, n'est pas aisée. Certains signes comportementaux peuvent néanmoins être considérés comme des manifestations de la douleur spontanée : élévation de la patte (Djoughri et al., 2006), léchage de la patte lésée, autotomie (Devor, 1991), vocalisation, modification de l'activité locomotrice, modification du poids supporté par les pattes ou incapacitance (Mogil and Crager, 2004). Les deux derniers paramètres font d'ailleurs l'objet de développements récents (Vrinten and Hamers, 2003; Millecamps et al., 2005; Richebe et al., 2005; King et al., 2006; Gabriel et al., 2008; Rivat et al., 2008). L'interrogation subsiste pour savoir si ces différents paramètres reflètent réellement la douleur plutôt que les dysesthésies, la peur ou le stress.

Le travail chez l'animal nous a, bien entendu, permis de vérifier le rôle du système de transduction JAK/STAT3 spinal dans la physiopathologie des douleurs neuropathiques post-lésionnelles. À l'aide des modèles animaux, nous avons pu étudier les conséquences de son

inhibition pharmacologique locale, puis, dans un deuxième temps, du blocage très ciblé aux cellules gliales de la moelle spinale, sur le développement de l'hypersensibilité douloureuse.

1.2 La technique d'injection intraparenchymale combinée à l'utilisation du vecteur lentiviral LV-SOCS3-V5

Afin de bloquer spécifiquement la voie de signalisation JAK/STAT3 dans les cellules gliales de la moelle épinière, il nous a fallu réaliser un ciblage préférentiel des cellules gliales dans la corne dorsale. Nous avons utilisé une approche développée précédemment au laboratoire par Alice Meunier. Elle combine une technique de microinjection directe dans le parenchyme médullaire et l'utilisation d'un vecteur lentiviral à fort tropisme glial.

Le choix de cette approche était-il le plus judicieux pour répondre aux questions posées ?

1.2.1 Le choix du vecteur LV-SOCS3-V5

Travaillant sur la douleur chronique, par définition une situation pathologique au long terme, et nous intéressant plus particulièrement aux cellules microgliales de la moelle épinière dorsale, il nous fallait trouver un outil qui permettait de répondre aux 3 exigences fondamentales :

- l'expression à long terme du transgène d'intérêt
- l'absence de réaction inflammatoire (participation à la sensibilisation centrale et potentiellement à l'activation de la voie JAK/STAT3)
- l'expression du transgène dans la microglie

Le transfert de gène peut être réalisé par diverses méthodes à l'aide de vecteurs viraux et non viraux. Ces derniers ont été écartés d'emblée car ils ne permettent ni une expression ciblée, ni soutenue du transgène et obligent à des injections répétées, non réalisables dans notre cas. Parmi les vecteurs viraux utilisés dans le SNC, les adénovirus, y compris des dernières générations, induisent une réaction inflammatoire incompatible avec notre protocole expérimental. Les vecteurs dérivés du virus de l'Herpès, très performants pour le ciblage de neurones sensoriels primaires, infectent très préférentiellement les neurones après administration intraparenchymale. Les vecteurs dérivés de *recombinant Simien Virus 40* (rSV40) apparaissent peu sélectifs et infectent aussi bien les cellules microgliales que les neurones (Louboutin et al., 2008). Les vecteurs dérivés de virus associés à l'adénovirus (AAV) sont souvent utilisés pour le transfert de gènes dans différents tissus car ils garantissent une expression soutenue et une plus grande sécurité d'utilisation (déficients pour la réplication, non toxiques, peu immunogènes). Suivant les sérotypes, le plus utilisé étant

AAV2, ils peuvent infecter surtout des neurones (Eaton et al., 2002) mais aussi des oligodendrocytes à l'aide d'un promoteur fort tissu-spécifique (Chen et al., 1998). Le sérotype AAV5, combiné avec l'utilisation d'un promoteur spécifique de la microglie, F4/80, a été utilisé pour transférer un gène rapporteur spécifiquement dans les cellules microgliales. L'expression du transgène apparaît cependant très faible et difficilement compatible avec les besoins de notre étude (Cucchiaroni et al., 2003).

Les vecteurs lentiviraux remplissent la plupart des conditions requises. Ce sont des virus intégratifs, c'est-à-dire que leur matériel génétique portant le transgène va s'intégrer dans le génome de la cellule infectée. Si cette caractéristique peut présenter des inconvénients pour leur utilisation clinique, elle apparaît intéressante dans le cadre d'une étude fondamentale puisqu'elle assure une expression à long terme. La primo-infection avec ces vecteurs n'induit pas de réponse inflammatoire. Dans le tissu cérébral, ces vecteurs ont été surtout décrits comme ayant un fort tropisme neuronal. Cependant, dans la moelle épinière, les vecteurs dérivé de l'HIV humain, pseudotypés avec une protéine d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G) et exprimant le transgène sous contrôle du promoteur du cytomégalovirus (CMV) permettent d'infecter très préférentiellement les cellules gliales (aussi bien astrocytes que microglie) (Pezet et al., 2006; Meunier et al., 2008).

Avec le même type de vecteur, une équipe a montré la possibilité de cibler spécifiquement différents types cellulaires. L'enveloppe virale est modifiée et porte à sa surface un anticorps, qui reconnaît un antigène spécifique d'une catégorie cellulaire, et une protéine fusogénique (qui permet la fusion dans les endosomes). Cette méthode n'est applicable qu'à condition que l'anticorps fixé à son antigène cible soient endocytés par la cellule ciblée (Yang et al., 2006). Bien qu'à priori intéressante, cette technique n'a, pour l'instant, été testée que pour cibler les cellules B et T (Ziegler et al., 2008; Yang et al., 2009).

Dans ce contexte, nous avons décidé d'utiliser le vecteur lentiviral (CMV-VSV) qui a déjà été bien caractérisé au laboratoire et qui permet l'expression à long terme du transgène très préférentiellement dans la microglie et les astrocytes de la moelle épinière. Bien que nos résultats soient clairement en faveur d'une activation de la voie JAK/STAT3 dans la microglie, on ne peut pas exclure que de manière minoritaire et non détectable avec les techniques immunohistochimiques utilisées, ce système soit également mis en jeu dans les astrocytes. Si tel était le cas, les données décrites (biochimiques et comportementales) pourraient bien résulter de la désactivation de la voie JAK/STAT3 dans les deux types cellulaires.

Comme nous l'avons mentionné lors des rappels bibliographiques, la protéine SOCS3 est la protéine inhibitrice endogène de la signalisation JAK/STAT3 mise en jeu par l'IL-6. Nos résultats ont, par ailleurs, montré que bien que son expression soit augmentée après lésion de nerf périphérique, la quantité de SOCS3 produite et/ou la durée limitée de son expression semblent insuffisantes pour restaurer l'état d'activation de la voie JAK/STAT3 avant lésion et ainsi empêcher la participation de cette voie à l'hypersensibilité douloureuse. En revanche, la surexpression de SOCS3 a montré de réelles capacités à diminuer les symptômes et les conséquences de différentes pathologies inflammatoires chez l'animal (Shouda et al., 2001; Jo et al., 2005; Ronn et al., 2008).

Pour l'ensemble des raisons décrites précédemment, nous avons choisi une approche expérimentale qui seule permet de surproduire la protéine SOCS3 localement et sélectivement dans les cellules gliales de la corne dorsale de la moelle épinière, au sein même du tissu où la signalisation JAK/STAT3 est mise en jeu.

1.2.2 Mode d'administration

À l'heure actuelle, la plupart des études *in vivo* à l'étage spinal sont réalisées à l'aide d'injections ou de perfusions intrathécales de divers composés. Bien que relativement facile à mettre en œuvre, cette technique d'administration permet d'atteindre la moelle épinière mais aussi les GRD (Ji et al., 2002; Obata et al., 2004; Zhuang et al., 2006). Afin de s'affranchir de cibles éventuelles au niveau périphérique et, surtout, de réaliser une transduction efficace du parenchyme médullaire, il est nécessaire d'injecter directement dans le tissu spinal aux étages correspondants aux sites de projections du nerf sciatique (L4, L5, L6).

Comme nous l'avons déjà souligné, pour étudier le retentissement de l'inhibition de la voie JAK/STAT3 sur l'activation des cellules microgliales et sur l'hypersensibilité douloureuse après lésion de nerf périphérique, nous devons utiliser une méthode d'injection du vecteur LV-SOCS3-V5 la moins invasive possible. En effet, les cellules gliales sont extrêmement sensibles à toute atteinte tissulaire. Afin d'éviter une laminectomie, généralement pratiquée pour atteindre le parenchyme médullaire (Pezet et al., 2006; Chen et al., 2007) qui est très invasive et provoque souvent une réaction inflammatoire massive, l'approche développée au laboratoire permet d'injecter le vecteur au travers d'une petite ouverture ménagée dans la vertèbre T13 (L4/L5 spinal). Ainsi pratiquée, l'injection d'un vecteur témoin (LV-EGFP) assure une expression locale du transgène dans la corne dorsale (pas de diffusion vers la partie

ventrale ou vers les GRD) sans induire de modifications biochimiques (pas de changement d'expression de gènes fortement inductibles [IL-6, iNOS,..] et comportementales (sensibilité douloureuse et locomotion) significatives par rapport aux rats non injectés (Meunier et al., 2007). L'ensemble de la technique d'injection est schématisé sur la Figure 17 (Meunier et al., 2007, 2008).

Par la suite, j'ai apporté quelques modifications à cette technique et notamment, l'utilisation de barres spécifiques, permettant de maintenir la colonne vertébrale du rat lors de l'intervention, a permis de diminuer l'amplitude des mouvements dus à la respiration de l'animal. Le risque d'éventuelles lésions de la moelle épinière provenant de l'activité respiratoire du rat est ainsi réduit (Ruitenbergh et al., 2002).

Afin de vérifier pour chaque animal que l'injection a été correcte, nous injectons conjointement les vecteurs LV-SOCS3-V5 et LV-EGFP (vecteur « traceur ») ; les animaux « contrôles » ne recevant que le vecteur témoin. Lors du sacrifice de l'animal, l'observation de la fluorescence émise par l'EGFP permet de déterminer rapidement les caractéristiques de l'injection (lieu, profondeur, étendue) et sa validité. Grâce à ce contrôle systématique, nous avons pu constater que les animaux CCI dont l'injection (LV-SOCS3-V5 + LV-EGFP) était « incorrecte » présentaient les seuils d'hypersensibilité douloureuse peu ou pas atténués en comparaison avec les animaux CCI non injectés ou injectés avec LV-EGFP seul (article 2). Cette vérification nous a permis de réduire considérablement le nombre d'animaux expérimentaux utilisés.

En conclusion, bien que la combinaison de l'utilisation d'un vecteur viral et de l'injection intra-parenchymale apparaisse complexe et délicate, elle se révèle un outil puissant pour disséquer les mécanismes spinaux qui se mettent en place après lésion de nerf périphérique (Meunier et al., 2007). Dans notre travail, cette méthode a permis de démontrer la participation au niveau spinal de la voie JAK/STAT3 gliale à l'induction de la production de plusieurs molécules proinflammatoires/algogènes et au développement de la douleur neuropathique.

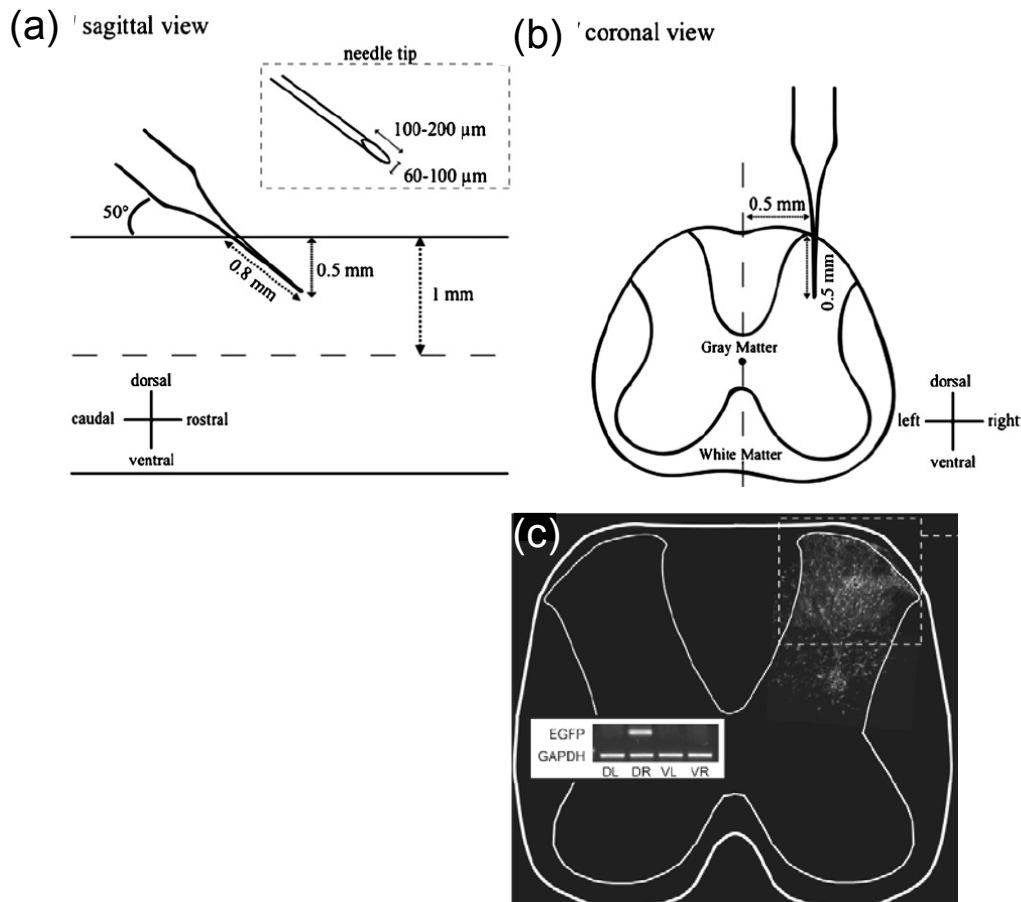


Figure 17 : La technique d'injection dans la corne dorsale de la moelle épinière du rat.

(a) (b) Après une incision limitée des muscles dorsaux (<1 cm), un petit trou est creusé dans la vertèbre T13 afin d'accéder à la surface de la moelle épinière. Toutes les précautions sont ensuite prises pour éliminer tout fragment osseux qui pourrait se glisser entre la moelle et la vertèbre et abîmer la moelle épinière. La graisse épidurale est délicatement réclinée au dessus du trou et une petite incision est pratiquée dans la dure-mère et l'arachnoïde pour faciliter la pénétration de l'électrode de verre lors de l'injection. L'injection est réalisée, avec un angle de 50° pour diminuer la résistance de la moelle, à l'aide d'une micropipette de verre terminée par un biseau (~80 µm). La solution virale est injectée avec un débit de 0.5µl/min pour assurer une bonne diffusion de la suspension et prévenir toute lésion des tissus avoisinant le site d'injection. A la fin de l'injection, l'électrode est encore laissée en place pendant 2 min pour éviter tout reflux.

(c) Coupe de moelle épinière après injection du vecteur LV-EGFP à l'aide de cette méthode. L'injection s'étend sur la quasi-totalité de la corne dorsale et permet une diffusion rostro-caudale d' ~3-4 mm (non présenté)

Extrait de Meunier et al., 2008.

2 Implication de la voie de signalisation JAK/STAT3 dans les lésions médullaires et périphériques

Les résultats présentés dans ce mémoire ont démontré la participation de la voie JAK/STAT3 dans le développement de l'hypersensibilité douloureuse après lésion de nerf périphérique. Une étude parue récemment (Lim et al., 2009) corrobore d'ailleurs une partie des résultats que nous avons publiés (Dominguez et al., 2008) et obtenus dans ce travail. Ces données sont les seules disponibles en ce qui concerne l'implication de la voie JAK/STAT3 dans la douleur. Néanmoins, la voie JAK/STAT3 étant mise en jeu par différentes cytokines (voir chapitre 3), elle est activée dans différents processus après lésion de nerf périphérique ou lésion de la moelle épinière. La voie JAK/STAT3 participe ainsi à la survie neuronale et à la régénération axonale après lésion de nerf, mais également à la régulation de l'astroglie après lésion de la moelle épinière.

2.1 La voie JAK/STAT3 est activée, à différents niveaux, après lésion de nerf périphérique

2.1.1 Activation de la voie JAK/STAT3 dans le nerf, les GRD lésés et la moelle épinière ventrale

La lésion d'un nerf périphérique s'accompagne de la libération de différents médiateurs dont certains vont jouer un rôle dans la régénération des axones lésés comme l'IL-6 (voir chapitre 2, 2.3.3), le CNTF ou le LIF. Ainsi, la voie de signalisation JAK/STAT3, utilisée par ces cytokines, est activée dans le nerf après axotomie. La forme phosphorylée de la protéine STAT3 est détectable au site de la lésion dès 15 min, est maximale à 12h et reste détectable jusqu'à 8 jours après axotomie (Sheu et al., 2000; Lee et al., 2004). À partir du site de la lésion, la phosphorylation de STAT3 s'étend aussi bien vers la périphérie que vers le GRD. L'activation de STAT3 dans le nerf peut avoir lieu dans les axones lésés mais également dans les cellules de Schwann activées par la lésion (Sheu et al., 2000; Lee et al., 2004). En effet, il a été récemment montré que l'IL-6 active STAT3 dans les cellules de Schwann et est responsable de l'expression de GFAP (par celles-ci) nécessaire à la régénération axonale (Lee et al., 2009). Toutefois, bien qu'une certaine corrélation ait été établie entre l'expression des ARNm IL-6 et l'activation de STAT3 dans le segment distal (vers la périphérie), il ne semble pas qu'il en soit de même pour le segment de nerf proximal (Sheu et al., 2000).

L'activation de la voie JAK/STAT3 se poursuit du côté proximal à la lésion. En effet, la forme phosphorylée de STAT3 est retrouvée dans le GRD lésé 6h après lésion et persiste

jusqu'à un mois (Lee et al., 2004; Qiu et al., 2005). De plus, l'expression des ARNm de SOCS3, sous contrôle de STAT3, est augmentée dans les neurones de moyen et de gros diamètre du GRD après lésion (Miao et al., 2006). À ce niveau, la voie JAK/STAT3 participe à la régénération axonale. En effet, STAT3 induit l'expression de GAP 43, un indicateur positif de la croissance axonale (Qiu et al., 2005) et la surexpression de SOCS3 diminue la repousse axonale (Miao et al., 2006). Par conséquent, la voie JAK/STAT3 joue un rôle prépondérant dans la survie neuronale et la régénération axonale après lésion (pour revue, voir Dziennis and Alkayed, 2008). La protéine STAT3 est responsable de la transcription de nombreux gènes qui peuvent être impliqués dans ces deux phénomènes (GAP 43, *small proline-rich protein 1A*, ...). D'autre part, la voie JAK/STAT3 intervient dans le contrôle de l'homéostasie du chlore. Après axotomie, on assiste à une augmentation du Cl⁻ intracellulaire dans les neurones lésés, responsable de la croissance rapide des neurites. Le contrôle de la concentration de Cl⁻ est assurée par le co-transporteur Na-K-Cl, NKCC1 dont la fonction est activée par phosphorylation après axotomie. Il s'avère que la voie JAK2/STAT3, activée par l'IL-6, est responsable de cette phosphorylation et ainsi de l'influx de Cl⁻ nécessaire à la croissance rapide des neurites (Pieraut et al., 2007; Pieraut et al., 2008).

L'activation de la voie JAK/STAT3 se perpétue également du côté moteur des projections du nerf lésé. Dans un modèle de section et de re-ligature du nerf sciatique (différent de celui que nous avons utilisé où le nerf est juste sectionné), la forme phosphorylée de STAT3 est présente dans les motoneurones de 24h à 2 semaines après lésion (Lee et al., 2004). À ce niveau, la signalisation JAK/STAT3 semble être déterminante pour la survie des motoneurones (Schweizer et al., 2002). Dans le modèle de section complète du nerf sciatique que nous avons pratiqué, aucun marquage n'a été observé dans les motoneurones.

Les résultats de Lee et ses collaborateurs obtenus en 2004 montraient une absence de marquage pSTAT3 dans la corne dorsale de la moelle épinière. Pourtant, nous avons montré que la voie JAK/STAT3 est bien activée dans la corne dorsale quasi-exclusivement dans la microglie. Ces résultats contradictoires semblent rendre compte de la différence des modèles utilisés (re-ligature du nerf sciatique après section).

L'ensemble des données citées précédemment montre que la voie JAK/STAT3 est activée tout le long des projections centrales du nerf lésé. Pour cette raison, il a été avancé que STAT3 serait, en plus d'être un facteur de transcription, un facteur de signalisation rétrograde (Lee et al., 2004; Qiu et al., 2005). Son transport dépendrait de la liaison de son *nuclear*

localization signal à la protéine motrice dynéine (Hanz et al., 2003). Néanmoins, en ce qui concerne l'activation de la voie dans la corne dorsale de la moelle épinière, nos résultats ont montré qu'il s'agissait clairement d'une activation locale et non d'une accumulation de pSTAT3 dans les projections des fibres sensorielles primaires.

D'autre part, la voie JAK/STAT3 participe à la régénération axonale après axotomie et de ce fait, pourrait jouer un rôle dans les phénomènes de *sprouting* impliqués dans le développement des douleurs neuropathiques (Xia et al., 2002).

2.1.2 Activation de la voie JAK/STAT3 dans la moelle épinière dorsale

Nous avons démontré l'activation de la voie JAK/STAT3 dans la moelle épinière dorsale ipsilatérale après lésion de nerf périphérique. Les résultats d'une étude récente suggèrent que la leptine serait également impliquée dans les douleurs neuropathiques au travers de l'activation de la voie JAK/STAT3 dans la moelle dorsale ipsilatérale à la lésion (CCI) du nerf (Lim et al., 2009). Les auteurs de ce travail ont caractérisé l'augmentation de l'expression du récepteur de la leptine sur les neurones et les astrocytes de la moelle épinière et ont montré que l'administration intrathécale d'un inhibiteur du récepteur de la leptine réduisait l'activité du système JAK/STAT3 spinal. Cependant, le type cellulaire concerné par l'activation de la voie JAK/STAT3 7j après CCI n'a pas été identifié.

En ce qui concerne notre étude, nous avons observé l'activation de la voie JAK/STAT3 quasi-exclusivement dans les cellules microgliales et quelques rares neurones dans plusieurs modèles de lésion de nerf périphérique (SNT, SNL, CCI). De fait, l'étude de l'immunoréactivité de la forme phosphorylée de STAT3 a montré, pour les temps où le marquage était bien présent (24h et 48h après lésion), que le profil des cellules marquées correspondait à la microglie. Toutefois, le même type d'expériences réalisé 7j après lésion n'a pas permis de mettre en évidence l'immunoréactivité pSTAT3. Cependant, comme nous l'avons discuté dans l'article 1, nous n'excluons pas que la voie soit activée dans d'autres types cellulaires à des temps différents et, au vu du travail de Lim et collaborateurs, on peut supposer, sous réserve que l'activation de la voie par la leptine soit directe, qu'elle peut avoir lieu également dans les neurones et les astrocytes 7 j après CCI (Lim et al., 2009).

Les cellules microgliales sont très sensibles aux changements qui peuvent survenir dans leur environnement et passent à l'état « activé » après lésion de nerf périphérique. La forme phosphorylée de STAT3 est présente massivement dans la microglie activée, mais certaines

cellules microgliales activées sont dépourvues de l'immunoréactivité pSTAT3. Par ailleurs, bien que nous ayons constaté une certaine corrélation entre le marqueur de l'activation microgliale ITGAM et l'expression de SOCS3, indice de l'activité de la voie JAK/STAT3, nous avons clairement montré que l'inhibition de la voie par l'inhibiteur de JAK2, AG490 (article 1) et par le vecteur LV-SOCS3 (article 2) n'entraînait pas de modification de l'activation microgliale. Par conséquent, la voie JAK/STAT3 ne semble pas impliquée de façon majeure dans l'activation de la microglie, du moins celle estimée par l'induction de la production du marqueur ITGAM.

D'après les résultats publiés dans l'article 1 avec le modèle SNL, l'IL-6 est majoritairement responsable de l'activation de la voie JAK/STAT3 48h après la lésion puisque l'immunoneutralisation de l'IL-6 par injection intrathécale d'anticorps anti-IL-6 bloque la phosphorylation de STAT3. Dans les temps précoces (24h/48h), l'IL-6 proviendrait surtout des neurones sensoriels primaires et serait libérée dans la corne dorsale de la moelle épinière. Dans les phases plus tardives (7j/15j), l'IL-6 est également produite *in situ* dans la moelle épinière et pourrait participer à la stimulation de la voie JAK/STAT3 (activation encore détectée à 15j par la technique de western blot). Par ailleurs, l'IL-6 et son récepteur spécifique IL-6R α sont exprimés par les neurones, les astrocytes et les cellules microgliales dans le cerveau; leurs expressions respectives augmentent d'ailleurs en cas de lésion (Yan et al., 1992; Schobitz et al., 1993; Gadiant and Otten, 1994). En supposant que leur distribution soit identique dans la moelle épinière, les 3 types cellulaires seraient sensibles à l'IL-6 et on peut se demander pourquoi la voie JAK/STAT3 est activée seulement dans la microglie. Nous pouvons tout de même faire l'hypothèse qu'une autre voie de signalisation mise en jeu par l'IL-6 pourrait être activée dans les autres types cellulaires comme la voie Ras/Raf/ERK1/2. Dans la microglie, la participation de l'IL-6 à l'activation microgliale (hausse de l'expression d'ITGAM) pourrait être également attribuée à l'activation de la voie ERK plutôt qu'à la voie JAK/STAT3 (Zhuang et al., 2005; Obata et al., 2007; Suter et al., 2007).

Dans la première partie de notre travail (article 1), nous nous sommes focalisés sur la démonstration de l'activation de la voie JAK/STAT3 et de son décours temporel dans deux modèles différents de lésion de nerfs périphériques (SNT, SNL). Nous avons ensuite choisi le modèle SNL, bien caractérisé comme un modèle de douleur neuropathique, pour vérifier le rôle d'IL-6 dans l'activation de ce système de signalisation et, finalement, pour étudier son implication dans les douleurs post-lésionnelles. Pour des raisons évoquées précédemment, nous avons abordé la suite de ce projet dans le modèle de constriction chronique du nerf sciatique (CCI). Dans ce modèle, le décours temporel de l'activation de la voie JAK/STAT3

n'a été estimé qu'au travers de la mesure de l'expression de SOCS3. Au vu de l'expression forte de SOCS3 à 10j, on peut supposer que la phosphorylation de STAT3 soit en effet maintenue après 48h. Dans cette partie du travail, nous n'avons pas cherché à confirmer le rôle de l'IL-6 dans l'activation de la voie JAK/STAT3 spinale après CCI. Néanmoins, de façon très comparable aux résultats obtenus dans les autres modèles lésionnels, l'expression de l'IL-6 est fortement induite dès 24h après CCI dans les GRD et la moelle épinière (Latrémolière et al., 2008). On peut émettre l'hypothèse qu'à 48h, au moment où la phosphorylation de STAT3 est fortement augmentée, l'IL-6 peut effectivement participer à son activation.

Le travail de Lim et collaborateurs, réalisé dans le modèle CCI, implique également la leptine dans l'activation de la voie JAK/STAT3 spinale et dans la mise en place de douleurs neuropathiques. L'expression de la leptine est augmentée 3j après CCI dans la moelle épinière ipsilatérale à la lésion et l'inhibition de ses récepteurs par administration intrathécale d'un antagoniste réduit la phosphorylation de STAT3 7j après CCI (Lim et al., 2009). Cependant, il est à noter que l'injection intrathécale de la leptine chez des rats naïfs ne produit qu'une modeste hypersensibilité aux stimulations thermiques et mécaniques, qui n'est réduite qu'en partie par le blocage de la voie JAK/STAT3.

Les données de Lim et collaborateurs permettent d'élargir nos observations et l'ensemble de ces résultats suggère qu'après la lésion de nerf périphérique la voie JAK/STAT3 spinale est mise en jeu de façon précoce notamment sous influence de l'IL-6, puis, dans les temps plus tardifs (à partir de 3j après lésion, au moment de la hausse de l'expression spinale de la leptine ?), la leptine maintiendrait son activité au niveau élevé.

2.2 La voie JAK/STAT3 est activée après lésion de la moelle épinière

La lésion traumatique de la moelle épinière (*spinal cord injury*, SCI) déclenche une série de modifications qui touchent les différents types cellulaires présents et qui impliquent, entre autres, l'IL-6 (Nakamura et al., 2005; Raineteau, 2008).

De fait, la voie de signalisation JAK/STAT3 est activée dans la moelle épinière dès 6h et jusqu'à 2 semaines après SCI. La forme phosphorylée de STAT3 est surtout détectée dans les astrocytes autour de la lésion (Okada et al., 2006; Herrmann et al., 2008), mais également dans les neurones et la microglie (Yamauchi et al., 2006). Suivant le modèle de SCI utilisé, on assiste à l'activation séquentielle de la voie JAK/STAT3 d'abord dans les neurones pour les

temps précoces après la lésion (12h), puis dans les astrocytes et la microglie après 48h (Yamauchi et al., 2006).

Après SCI, l'activation de la voie JAK/STAT3 a surtout été étudiée dans les astrocytes où elle est nécessaire à la formation de la cicatrice gliale. En effet, des études réalisées sur des souris transgéniques dont l'expression de STAT3 a été inactivée dans les astrocytes ont démontré que la voie JAK/STAT3 jouait un rôle prépondérant dans la migration des astrocytes impliquée dans la formation de la cicatrice gliale après SCI (Okada et al., 2006). Par ailleurs, STAT3 interviendrait également dans l'expression de GFAP et l'hypertrophie astrocytaire associées à la lésion spinale (Herrmann et al., 2008). L'expression de STAT3 permet en outre d'améliorer la récupération fonctionnelle après SCI (Yamauchi et al., 2006; Herrmann et al., 2008).

Ces données suggèrent que la voie JAK/STAT3 serait indispensable à la formation de la cicatrice gliale dont le rôle de barrière physique et chimique permet de restreindre l'invasion des cellules inflammatoires et ainsi d'assurer la protection du tissu environnant. En revanche, dans les phases tardives après SCI, la cicatrice gliale limite la régénération et la repousse axonale (Okada et al., 2006).

2.3 Les effecteurs potentiels de la voie JAK/STAT3

La voie JAK/STAT3 est impliquée dans le contrôle de l'expression d'une multitude de gènes (Ehret et al., 2001). Dans le système nerveux, certains gènes cibles du facteur de transcription STAT3 ont été identifiés et nous en citerons quelques exemples.

Dans les astrocytes et les cellules de Schwann, l'expression de la protéine des filaments intermédiaires GFAP est sous contrôle de STAT3 (Sriram et al., 2004; Cao et al., 2006; Damiani and O'Callaghan, 2007; Lee et al., 2009). Par ailleurs, la régulation de l'expression de la connexine 43 et le couplage intercellulaire des astrocytes est contrôlé par la voie JAK/STAT3 activée par le CNTF (Ozog et al., 2004). La synthèse de la protéine d'adhésion ICAM-1, augmentée au niveau spinal dans certains modèles de douleurs chroniques (Werner et al., 1998; Sweitzer et al., 2002; Rodriguez Parkitna et al., 2006), est également placée sous contrôle de STAT3 dans les cellules gliales (Kim et al., 2006). D'autres gènes enfin, dont les produits sont bien connus pour leur implication dans l'inflammation et dans les douleurs chroniques, sont régulés par STAT3. Citons par exemple COX-2 (Rummel et al., 2006), iNOS (Huang et al., 2008) et, par un effet autorégulateur, l'IL-6 elle-même (Van Wagoner et al., 1999).

L'activité de la voie JAK/STAT3 est également impliquée dans certains aspects de la régulation de l'homéostasie ionique. Dans les neurones sensoriels primaires, elle contrôle notamment l'expression des canaux calciques de type T (Pachuaud and Martin-Caraballo, 2007; Trimarchi et al., 2009), dont le rôle dans les douleurs chroniques neuropathiques a été mise évidence récemment (Bourinet et al., 2005; Jagodic et al., 2008; Na et al., 2008). De plus, rappelons qu'après axotomie de neurones sensoriels le co-transporteur NKCC1, phosphorylé par la voie JAK2/STAT3, permet d'augmenter la concentration des ions Cl⁻ favorisant ainsi l'élongation rapide des neurites (Pieraut et al., 2008).

La voie JAK/STAT3 est active dans bien d'autres types cellulaires. Par exemple, il a été montré que dans les cellules mésangiales ou la lignée monoblastique, STAT3 contrôle l'expression de la chimiokine MCP-1, un des signaux potentiels de communication neurone-microglie (chapitre 2, 2.2.2.3) (Hartner et al., 1997; Ikeda et al., 2002). Dans les macrophages, de façon comparable à l'autorégulation de l'expression de l'IL-6, la cytokine anti-inflammatoire IL-10 peut induire sa propre production par la mise en jeu de STAT3 (Staples et al., 2007).

2.4 Perspectives de l'étude

L'ensemble des résultats obtenus lors de cette étude suscitent de nombreuses questions qui pourront être abordées lors de travaux futurs. Par exemple, parmi la multitude d'activateurs potentiels de la voie, l'IL-6 et la leptine sont-elles les seules responsables de l'activation de la voie JAK/STAT3 dans la moelle épinière après lésion de nerf périphérique ? Quel peut être le rôle de la voie JAK/STAT3 activée aux autres niveaux (nerfs, GRD) dans la douleur neuropathique ?

Sans aborder l'ensemble de ces questions dans ce paragraphe, nous évoquerons deux perspectives de travail qui, nous le pensons, méritent d'être développées. La première concerne la voie JAK/STAT3 dans les GRD et sa participation éventuelle à la mise en place des douleurs chroniques. La seconde, propose d'évaluer la contribution potentielle des gangliosides à l'activation de la voie JAK/STAT3 spinale.

2.4.1 Évaluation du rôle de la voie JAK/STAT3 activée dans les GRD dans l'hypersensibilité douloureuse

Les résultats qui ont fait l'objet de ce manuscrit ont démontré non seulement l'activation de la voie JAK/STAT3 dans la moelle épinière après lésion de nerf périphérique mais également sa participation à la mise en place de la douleur post-lésionnelle. Ce travail se poursuit et, en

particulier, nous évaluons la contribution de ce système de signalisation au maintien de la douleur à long terme, et, par conséquent, sont intérêt éventuel comme cible thérapeutique des douleurs déjà établies.

Toutefois, comme nous venons de le souligner, cette voie est également activée dans les neurones lésés (GRD) et son rôle dans la douleur chronique n'a été évalué que partiellement. Les travaux de l'équipe de Michaela Kress ont démontré l'importance de l'IL-6 dans la sensibilisation à la chaleur des neurones sensoriels primaires (Obreja et al., 2005). En effet, l'injection conjointe de l'IL-6 et de son récepteur soluble (sIL-6R) dans la patte induit une hyperalgésie à la chaleur chez des animaux naïfs. L'hypersensibilité est absente chez des souris dépourvues du récepteur à la capsaïcine TRPV1. D'autre part, l'inactivation du gène de la sous-unité de transduction du signal gp130 réduit également l'hyperalgésie à la chaleur (Benetti et al., 2008). Ainsi, l'IL-6 et sIL-6R vont utiliser la sous-unité gp130 pour activer les kinases JAK1, JAK2 et la PKC δ , responsable de la sensibilisation des récepteurs TRPV1 probablement via leur phosphorylation (Obreja et al., 2005).

Cependant, cette cascade d'activation ne semble pas partagée par d'autres cytokines appartenant à la famille de l'IL-6 et utilisant également la gp130. En effet, si l'injection dans la patte d'oncostatine M induit également une hyperalgésie à la chaleur, absente chez les animaux TRPV1 $-/-$, celle-ci n'est pas modifiée par la délétion de gp130 (Constantin et al., 2008).

Quoi qu'il en soit, la sous-unité gp130 et les kinases JAK1 et JAK2, composants du système de transduction du signal JAK/STAT, jouent un rôle évident dans l'hypersensibilité à la chaleur évoquée par l'IL-6. Pourtant, la mise en jeu des facteurs de transcription STAT (et en particulier STAT3) n'a pas été évaluée dans ces différents travaux. De plus, soulignons que la PKC δ qui contribue également à la sensibilisation de TRPV1 peut interagir avec STAT3 et réguler la signalisation de l'IL-6 (Novotny-Diermayr et al., 2002).

L'importance de la signalisation via la sous-unité gp130 dans les neurones sensoriels a été d'ailleurs récemment confortée par M. Kress. L'équipe a montré que la délétion de cette sous-unité dans les afférences sensorielles primaires diminuait l'hyperalgésie thermique dans des modèles de douleurs inflammatoire et cancéreuse, mais apparemment pas neuropathique (Kress, 2009).

Comme nous l'avons souligné précédemment, la voie JAK/STAT3 joue un rôle neuroprotecteur avéré dans les neurones sensoriels primaires. Son activité est partie intégrante des mécanismes de survie et de régénération neuronales qui sont mis en jeu après lésion de nerf périphérique. Il est essentiel ainsi d'évaluer, en complément des travaux de Kress et al., les conséquences de l'inactivation de la sous-unité gp130 sur la réaction neuronale à la lésion et ses capacités de régénération.

Dans ce contexte particulier, il semble délicat d'étudier le rôle de la voie JAK/STAT3 des neurones sensoriels primaires dans l'apparition des douleurs neuropathiques en le séparant de son implication dans les phénomènes post-lésionnels. En revanche, il serait intéressant de vérifier l'état d'activation de ce système de transduction dans les neurones sensoriels (et dans la moelle épinière) dans un modèle de douleur neuropathique induite par un traitement chimique (vincristine, dideoxycytidine,..) qui ne fait pas appel à une lésion traumatique du nerf périphérique.

2.4.2 Contribution potentielle des gangliosides à l'activation de la voie JAK/STAT3 spinale

Dans la moelle épinière, nous avons démontré l'activation de la voie JAK/STAT3 quasi-exclusivement dans les cellules microgliales. Comme nous l'avons soulevé précédemment, les données obtenues à ce jour ne permettent pas d'expliquer pourquoi, dans les temps précoces après la lésion, la voie est activée seulement dans ce type cellulaire. Il apparaît, qu'en dehors de l'IL-6 ou de la leptine, d'autres molécules puissent exercer leurs effets dans la moelle épinière au travers de ce système de signalisation et participer, peut-être graduellement, à sa mise en jeu.

L'activation de la voie JAK/STAT3 a été rapportée dans des cultures de microglie corticale après stimulation par les gangliosides (Kim et al., 2002; Kim et al., 2003). Les gangliosides sont des glycolipides acides dont les chaînes oligosaccharidiques sont terminées par des résidus d'acides sialiques. Ce sont des constituants des membranes de cellules de mammifères, particulièrement abondants sur les membranes neuronales. Il a été montré qu'une lésion cérébrale déclenchait la libération de gangliosides à partir des neurones atteints et que ces molécules participaient aux altérations physiopathologiques associées à la lésion (Michikawa et al., 2001). Les gangliosides sont capables de stimuler la production de médiateurs inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-6, NO, COX-2) par la microglie, dont l'amplitude varie suivant le type de gangliosides. Les gangliosides activent la microglie à l'aide des récepteurs

TLR2 et TLR4 notamment (Jou et al., 2006; Yoon et al., 2008), et par la mise en jeu de différentes voies de signalisation (Pyo et al., 1999; Min et al., 2004a, 2004b; Park et al., 2008). L'acide sialique, un des composants des gangliosides, est primordial pour activer la voie JAK/STAT3 dans la microglie (Kim et al., 2002). Lors de douleurs neuropathiques, les charges négatives portées par l'acide sialique sur les membranes neuronales contribuent aux décharges ectopiques spontanées observées dans le nerf (Zhang et al., 2003) et les oscillations du potentiel de membrane dans le GRD (Li et al., 2007). Malgré cela, les gangliosides semblent jouer un rôle dans la régénération des fibres lésées après lésion de nerf périphérique, au même titre que la voie JAK/STAT3 (Ribeiro-Resende et al., 2007).

Dans l'ensemble du tissu nerveux, la présence de gangliosides est indispensable pour le maintien de la myéline et l'intégrité des fibres nerveuses (Ma et al., 2003). Après lésion de nerf périphérique, nous pouvons émettre l'hypothèse que les neurones lésés libèrent des gangliosides de la même manière qu'au niveau cérébral. Les gangliosides vont alors pouvoir activer la microglie et être assimilés, au même titre que la fractalkine ou la chimiokine MCP-1, à des signaux de communication neurone-microglie. L'acide sialique qu'ils contiennent pourrait déclencher l'activation de la voie JAK/STAT3 observée. Certaines données obtenues *in vitro* vont dans ce sens. En effet, dans les cultures primaires de cellules microgliales stimulées par les gangliosides, l'inhibition de la voie JAK/STAT3 diminue l'expression de MCP-1 (Kim et al., 2002). Ce résultat est à rapprocher de nos observations réalisées dans la moelle épinière chez les rats CCI injectés avec le LV-SOCS3-V5 (article 2).

L'ensemble de ces données laisse à penser que le rôle joué par les gangliosides dans la communication neurone-microglie au niveau de la moelle épinière et sa participation éventuelle à l'activation de la voie JAK/STAT3 après lésion de nerf périphérique méritent d'être évalués.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les douleurs neuropathiques, qui apparaissent souvent après lésion de nerf périphérique, s'accompagnent de profondes altérations observées notamment au niveau spinal. L'élucidation de certains des mécanismes impliqués dans ce type de douleurs a permis de mettre en évidence la participation des cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-6, à l'hypersensibilité douloureuse après lésion de nerf périphérique.

Dans ce travail, nous avons montré qu'en réponse à la lésion de nerf périphérique, une voie importante de signalisation de l'IL-6, la voie JAK/STAT3, était mise en jeu dans la moelle épinière de façon précoce et prolongée. La désactivation de ce système de transduction dans la moelle épinière, réalisée par différents moyens et notamment au travers d'une production ciblée d'un inhibiteur physiologique de cette voie - la protéine SOCS3 - nous a permis de démontrer la participation du système JAK/STAT3 au développement du contexte neuroinflammatoire spinal et de la douleur qui accompagnent l'altération de nerf périphérique.

Outre l'IL-6, d'autres molécules de signalisation peuvent activer cette voie, et très récemment la participation de la leptine à l'activation de JAK/STAT3 médullaire a été montrée. Les données de la littérature et nos résultats préliminaires suggèrent que les gangliosides, composants importants des membranes plasmiques neuronales, pourraient exercer certains de leurs effets au travers de cette voie de signalisation.

Ce travail a été le premier à évaluer la mise en jeu de la voie JAK/STAT3 dans la moelle épinière en relation avec les douleurs neuropathiques. Il est évident que la compréhension du rôle de ce système de signalisation dans la moelle épinière n'est qu'à ces débuts. Dans les travaux à venir, nous devons nous attacher, en particulier, à évaluer les conséquences « bénéfiques » de l'activation du système JAK/STAT3 (réactions post-lésionnelles de survie et de réparation) et celles réellement « nuisibles » et impliquées dans la physiopathologie des douleurs chroniques.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akira S, Yoshida K, Tanaka T, Taga T, Kishimoto T (1995) Targeted disruption of the IL-6 related genes: gp130 and NF-IL-6. *Immunol Rev* 148:221-253.
- Araque A, Li N, Doyle RT, Haydon PG (2000) SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci* 20:666-673.
- Arruda JL, Colburn RW, Rickman AJ, Rutkowski MD, DeLeo JA (1998) Increase of interleukin-6 mRNA in the spinal cord following peripheral nerve injury in the rat: potential role of IL-6 in neuropathic pain. *Brain Res Mol Brain Res* 62:228-235.
- Arruda JL, Sweitzer S, Rutkowski MD, DeLeo JA (2000) Intrathecal anti-IL-6 antibody and IgG attenuates peripheral nerve injury-induced mechanical allodynia in the rat: possible immune modulation in neuropathic pain. *Brain Res* 879:216-225.
- Auernhammer CJ, Bousquet C, Melmed S (1999) Autoregulation of pituitary corticotroph SOCS-3 expression: characterization of the murine SOCS-3 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6964-6969.
- Babon JJ, McManus EJ, Yao S, DeSouza DP, Mielke LA, Sprigg NS, Willson TA, Hilton DJ, Nicola NA, Baca M, Nicholson SE, Norton RS (2006) The structure of SOCS3 reveals the basis of the extended SH2 domain function and identifies an unstructured insertion that regulates stability. *Mol Cell* 22:205-216.
- Bartholdi D, Schwab ME (1997) Expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord injury in mouse: an in situ hybridization study. *Eur J Neurosci* 9:1422-1438.
- Basbaum AI, Bushnell MC, Campbell JN, Chaplan SR, Mantyh PW, Porreca F, Pride DD, Urban L, Vierck CJ, Zubieta J-K (2006) Measurement and new technologies: rapporteur report. In: *Emerging strategies for the treatment of neuropathic pain* (Campbell JN, Basbaum AI, Dray R, Dubner R, Dworkin RH, Sang CN, eds), pp 361-381. Seattle: IASP Press.
- Basbaum AI, Fields HL (1984) Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci* 7:309-338.
- Bauer S, Kerr BJ, Patterson PH (2007) The neuropoietic cytokine family in development, plasticity, disease and injury. *Nat Rev Neurosci* 8:221-232.
- Benetti C, Andratsch M, Mair N, Brockhaus J, Zeilhofer HU, Kress M (2008) The role of interleukin 6 (IL-6) and its signal transducer gp130 in the peripheral and central pain pathway. In: *FENS Forum*. Geneva (Swiss).
- Bennett GJ, Xie YK (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33:87-107.
- Bergamin E, Wu J, Hubbard SR (2006) Structural basis for phosphotyrosine recognition by suppressor of cytokine signaling-3. *Structure* 14:1285-1292.
- Berlato C, Cassatella MA, Kinjyo I, Gatto L, Yoshimura A, Bazzoni F (2002) Involvement of suppressor of cytokine signaling-3 as a mediator of the inhibitory effects of IL-10 on lipopolysaccharide-induced macrophage activation. *J Immunol* 168:6404-6411.
- Bettoni I, Comelli F, Rossini C, Granucci F, Giagnoni G, Peri F, Costa B (2008) Glial TLR4 receptor as new target to treat neuropathic pain: efficacy of a new receptor antagonist in a model of peripheral nerve injury in mice. *Glia* 56:1312-1319.

- Bianchi R, Giambanco I, Donato R (2008) S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF-kappaB and AP-1 Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1beta and TNF-alpha. *Neurobiol Aging*.
- Biber K, Neumann H, Inoue K, Boddeke HW (2007) Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. *Trends Neurosci* 30:596-602.
- Biber K, Vinet J, Boddeke HW (2008) Neuron-microglia signaling: chemokines as versatile messengers. *J Neuroimmunol* 198:69-74.
- Blackbeard J, O'Dea KP, Wallace VC, Segerdahl A, Pheby T, Takata M, Field MJ, Rice AS (2007) Quantification of the rat spinal microglial response to peripheral nerve injury as revealed by immunohistochemical image analysis and flow cytometry. *J Neurosci Methods* 164:207-217.
- Blackburn-Munro G, Blackburn-Munro RE (2001) Chronic pain, chronic stress and depression: coincidence or consequence? *J Neuroendocrinol* 13:1009-1023.
- Blackburn-Munro G (2004) Pain-like behaviours in animals - how human are they? *Trends Pharmacol Sci* 25:299-305.
- Bode JG, Ludwig S, Freitas CA, Schaper F, Ruhl M, Melmed S, Heinrich PC, Haussinger D (2001) The MKK6/p38 mitogen-activated protein kinase pathway is capable of inducing SOCS3 gene expression and inhibits IL-6-induced transcription. *Biol Chem* 382:1447-1453.
- Bode JG, Nimmesgern A, Schmitz J, Schaper F, Schmitt M, Frisch W, Haussinger D, Heinrich PC, Graeve L (1999) LPS and TNFalpha induce SOCS3 mRNA and inhibit IL-6-induced activation of STAT3 in macrophages. *FEBS Lett* 463:365-370.
- Bolin LM, Verity AN, Silver JE, Shooter EM, Abrams JS (1995) Interleukin-6 production by Schwann cells and induction in sciatic nerve injury. *J Neurochem* 64:850-858.
- Bouhassira D (2007) Difficultés de l'application des modèles physiopathologiques à la clinique. In: SFETD: douleurs neuropathiques. Paris La Défense.
- Bourinet E, Alloui A, Monteil A, Barrere C, Couette B, Poirot O, Pages A, McRory J, Snutch TP, Eschalier A, Nargeot J (2005) Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *Embo J* 24:315-324.
- Boyce S, Hill RG (2000) Discrepant results from preclinical and clinical studies on the potential of substance P-receptor antagonist compounds as analgesics. In: Proceedings of the 9th world congress on pain (M. D, M.C. R, Z. W-H, eds), pp 313-324. Seattle: IASP Press.
- Boyle K, Egan P, Rakar S, Willson TA, Wicks IP, Metcalf D, Hilton DJ, Nicola NA, Alexander WS, Roberts AW, Robb L (2007) The SOCS box of suppressor of cytokine signaling-3 contributes to the control of G-CSF responsiveness in vivo. *Blood* 110:1466-1474.
- Boyle K, Zhang JG, Nicholson SE, Trounson E, Babon JJ, McManus EJ, Nicola NA, Robb L (2009) Deletion of the SOCS box of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) in embryonic stem cells reveals SOCS box-dependent regulation of JAK but not STAT phosphorylation. *Cell Signal* 21:394-404.
- Brown S, Zeidler MP (2008) Unphosphorylated STATs go nuclear. *Curr Opin Genet Dev* 18:455-460.

- Burgess SE, Gardell LR, Ossipov MH, Malan TP, Jr., Vanderah TW, Lai J, Porreca F (2002) Time-dependent descending facilitation from the rostral ventromedial medulla maintains, but does not initiate, neuropathic pain. *J Neurosci* 22:5129-5136.
- Burnstock G (2008) Unresolved issues and controversies in purinergic signalling. *J Physiol*.
- Cacalano NA, Sanden D, Johnston JA (2001) Tyrosine-phosphorylated SOCS-3 inhibits STAT activation but binds to p120 RasGAP and activates Ras. *Nat Cell Biol* 3:460-465.
- Calvino B, Grilo RM (2006) Central pain control. *Joint Bone Spine* 73:10-16.
- Campana WM (2007) Schwann cells: activated peripheral glia and their role in neuropathic pain. *Brain Behav Immun* 21:522-527.
- Canfield S, Lee Y, Schroder A, Rothman P (2005) Cutting edge: IL-4 induces suppressor of cytokine signaling-3 expression in B cells by a mechanism dependent on activation of p38 MAPK. *J Immunol* 174:2494-2498.
- Cao F, Hata R, Zhu P, Ma YJ, Tanaka J, Hanakawa Y, Hashimoto K, Niinobe M, Yoshikawa K, Sakanaka M (2006) Overexpression of SOCS3 inhibits astroglialogenesis and promotes maintenance of neural stem cells. *J Neurochem* 98:459-470.
- Cao H, Zhang YQ (2008) Spinal glial activation contributes to pathological pain states. *Neurosci Biobehav Rev* 32:972-983.
- Cao L, Tanga FY, Deleo JA (2008) The contributing role of CD14 in toll-like receptor 4 dependent neuropathic pain. *Neuroscience*.
- Chen H, McCarty DM, Bruce AT, Suzuki K, Suzuki K (1998) Gene transfer and expression in oligodendrocytes under the control of myelin basic protein transcriptional control region mediated by adeno-associated virus. *Gene Ther* 5:50-58.
- Chen R, Cohen LG, Hallett M (2002) Nervous system reorganization following injury. *Neuroscience* 111:761-773.
- Chen SH, Benveniste EN (2004) Oncostatin M: a pleiotropic cytokine in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev* 15:379-391.
- Chen SL, Ma HI, Han JM, Tao PL, Law PY, Loh HH (2007) dsAAV type 2-mediated gene transfer of MORS196A-EGFP into spinal cord as a pain management paradigm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:20096-20101.
- Chiang CS, Stalder A, Samimi A, Campbell IL (1994) Reactive gliosis as a consequence of interleukin-6 expression in the brain: studies in transgenic mice. *Dev Neurosci* 16:212-221.
- Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K (1997) Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278:1803-1805.
- Clark AK, Yip PK, Grist J, Gentry C, Staniland AA, Marchand F, Dehvari M, Wotherspoon G, Winter J, Ullah J, Bevan S, Malcangio M (2007) Inhibition of spinal microglial cathepsin S for the reversal of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10655-10660.
- Colburn RW, DeLeo JA, Rickman AJ, Yeager MP, Kwon P, Hickey WF (1997) Dissociation of microglial activation and neuropathic pain behaviors following peripheral nerve injury in the rat. *J Neuroimmunol* 79:163-175.
- Colburn RW, Rickman AJ, DeLeo JA (1999) The effect of site and type of nerve injury on spinal glial activation and neuropathic pain behavior. *Exp Neurol* 157:289-304.

- Constantin CE, Andratsch M, Scherbakov N, Mair N, Kress M (2008) Oncostatin M causes heat hyperalgesia by sensitising TRPV1 in sensory neurons. In: FENS Forum. Geneva (Swiss).
- Copray JC, Mantingh I, Brouwer N, Biber K, Kust BM, Liem RS, Huitinga I, Tilders FJ, Van Dam AM, Boddeke HW (2001) Expression of interleukin-1 beta in rat dorsal root ganglia. *J Neuroimmunol* 118:203-211.
- Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y (2005) BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438:1017-1021.
- Coull JA, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, Sik A, De Koninck P, De Koninck Y (2003) Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 424:938-942.
- Coyle DE (1998) Partial peripheral nerve injury leads to activation of astroglia and microglia which parallels the development of allodynic behavior. *Glia* 23:75-83.
- Crocker BA, Kiu H, Nicholson SE (2008) SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol* 19:414-422.
- Crocker BA, Krebs DL, Zhang JG, Wormald S, Willson TA, Stanley EG, Robb L, Greenhalgh CJ, Forster I, Clausen BE, Nicola NA, Metcalf D, Hilton DJ, Roberts AW, Alexander WS (2003) SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nat Immunol* 4:540-545.
- Cucchiari M, Ren XL, Perides G, Terwilliger EF (2003) Selective gene expression in brain microglia mediated via adeno-associated virus type 2 and type 5 vectors. *Gene Ther* 10:657-667.
- D'Arcangelo G, Tancredi V, Onofri F, D'Antuono M, Giovedi S, Benfenati F (2000) Interleukin-6 inhibits neurotransmitter release and the spread of excitation in the rat cerebral cortex. *Eur J Neurosci* 12:1241-1252.
- Damiani CL, O'Callaghan JP (2007) Recapitulation of cell signaling events associated with astrogliosis using the brain slice preparation. *J Neurochem* 100:720-726.
- Decker T, Kovarik P (2000) Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 19:2628-2637.
- Decosterd I, Woolf CJ (2000) Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87:149-158.
- De Jongh RF, Vissers KC, Meert TF, Booij LH, De Deyne CS, Heylen RJ (2003) The role of interleukin-6 in nociception and pain. *Anesth Analg* 96:1096-1103, table of contents.
- De Leo JA, Tawfik VL, LaCroix-Fralish ML (2006) The tetrapartite synapse: path to CNS sensitization and chronic pain. *Pain* 122:17-21.
- DeLeo JA, Colburn RW, Nichols M, Malhotra A (1996) Interleukin-6-mediated hyperalgesia/allodynia and increased spinal IL-6 expression in a rat mononeuropathy model. *J Interferon Cytokine Res* 16:695-700.
- DeLeo JA, Colburn RW, Rickman AJ (1997) Cytokine and growth factor immunohistochemical spinal profiles in two animal models of mononeuropathy. *Brain Res* 759:50-57.
- Delgado PL (2004) Common pathways of depression and pain. *J Clin Psychiatry* 65 Suppl 12:16-19.
- D'Mello R, Dickenson AH (2008) Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth*.

- Devor M (1991) Sensory basis of autotomy in rats. *Pain* 45:109-110.
- Devor M (2006) Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. *J Pain* 7:S3-S12.
- Djoughri L, Koutsikou S, Fang X, McMullan S, Lawson SN (2006) Spontaneous pain, both neuropathic and inflammatory, is related to frequency of spontaneous firing in intact C-fiber nociceptors. *J Neurosci* 26:1281-1292.
- Dowdall T, Robinson I, Meert TF (2005) Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury. *Pharmacol Biochem Behav* 80:93-108.
- Dubovy P, Svizenska I, Klusakova I, Nuta M, Jancalek R (2008) Changes in immunofluorescence staining for IL-6, IL-6r, and gp130 in the rat dorsal root ganglia of neuropathic pain model. In: FENS Forum. Geneva (Swiss).
- Dziennis S, Alkayed NJ (2008) Role of signal transducer and activator of transcription 3 in neuronal survival and regeneration. *Rev Neurosci* 19:341-361.
- Eaton MJ, Blits B, Ruitenber MJ, Verhaagen J, Oudega M (2002) Amelioration of chronic neuropathic pain after partial nerve injury by adeno-associated viral (AAV) vector-mediated over-expression of BDNF in the rat spinal cord. *Gene Ther* 9:1387-1395.
- Echeverry S, Shi XQ, Zhang J (2007) Characterization of cell proliferation in rat spinal cord following peripheral nerve injury and the relationship with neuropathic pain. *Pain*.
- Ehrling C, Lai WS, Schaper F, Brenndorfer ED, Matthes RJ, Heinrich PC, Ludwig S, Blackshear PJ, Gaestel M, Haussinger D, Bode JG (2007) Regulation of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) mRNA stability by TNF-alpha involves activation of the MKK6/p38MAPK/MK2 cascade. *J Immunol* 178:2813-2826.
- Ehret GB, Reichenbach P, Schindler U, Horvath CM, Fritz S, Nabholz M, Bucher P (2001) DNA binding specificity of different STAT proteins. Comparison of in vitro specificity with natural target sites. *J Biol Chem* 276:6675-6688.
- Emery B, Butzkueven H, Snell C, Binder M, Kilpatrick TJ (2006) Oligodendrocytes exhibit selective expression of suppressor of cytokine signaling genes and signal transducer and activator of transcription 1 independent inhibition of interferon-gamma-induced toxicity in response to leukemia inhibitory factor. *Neuroscience* 137:463-472.
- Empl M, Renaud S, Erne B, Fuhr P, Straube A, Schaeren-Wiemers N, Steck AJ (2001) TNF-alpha expression in painful and nonpainful neuropathies. *Neurology* 56:1371-1377.
- Fattori E, Lazzaro D, Musiani P, Modesti A, Alonzi T, Ciliberto G (1995) IL-6 expression in neurons of transgenic mice causes reactive astrocytosis and increase in ramified microglial cells but no neuronal damage. *Eur J Neurosci* 7:2441-2449.
- Fellin T, Sul JY, D'Ascenzo M, Takano H, Pascual O, Haydon PG (2006) Bidirectional astrocyte-neuron communication: the many roles of glutamate and ATP. *Novartis Found Symp* 276:208-217; discussion 217-221, 233-207, 275-281.
- Ferreira SH, Lorenzetti BB, Bristow AF, Poole S (1988) Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature* 334:698-700.
- Field MJ, Bramwell S, Hughes J, Singh L (1999a) Detection of static and dynamic components of mechanical allodynia in rat models of neuropathic pain: are they signalled by distinct primary sensory neurones? *Pain* 83:303-311.

- Field MJ, McCleary S, Hughes J, Singh L (1999b) Gabapentin and pregabalin, but not morphine and amitriptyline, block both static and dynamic components of mechanical allodynia induced by streptozocin in the rat. *Pain* 80:391-398.
- Fields HL, Bry J, Hentall I, Zorman G (1983) The activity of neurons in the rostral medulla of the rat during withdrawal from noxious heat. *J Neurosci* 3:2545-2552.
- Fischer P, Lehmann U, Sobota RM, Schmitz J, Niemand C, Linnemann S, Haan S, Behrmann I, Yoshimura A, Johnston JA, Muller-Newen G, Heinrich PC, Schaper F (2004) The role of the inhibitors of interleukin-6 signal transduction SHP2 and SOCS3 for desensitization of interleukin-6 signalling. *Biochem J* 378:449-460.
- Flatters SJ, Fox AJ, Dickenson AH (2003) Spinal interleukin-6 (IL-6) inhibits nociceptive transmission following neuropathy. *Brain Res* 984:54-62.
- Flatters SJ, Fox AJ, Dickenson AH (2004) Nerve injury alters the effects of interleukin-6 on nociceptive transmission in peripheral afferents. *Eur J Pharmacol* 484:183-191.
- Fujimoto M, Naka T (2003) Regulation of cytokine signaling by SOCS family molecules. *Trends Immunol* 24:659-666.
- Fujita R, Ma Y, Ueda H (2008) Lysophosphatidic acid-induced membrane ruffling and brain-derived neurotrophic factor gene expression are mediated by ATP release in primary microglia. *J Neurochem* 107:152-160.
- Fukuoka H, Kawatani M, Hisamitsu T, Takeshige C (1994) Cutaneous hyperalgesia induced by peripheral injection of interleukin-1 beta in the rat. *Brain Res* 657:133-140.
- Gabriel AF, Marcus MA, Walenkamp GH, Joosten EA (2008) The CatWalk method: Assessment of mechanical allodynia in experimental chronic pain. *Behav Brain Res*.
- Gadient RA, Otten U (1994) Identification of interleukin-6 (IL-6)-expressing neurons in the cerebellum and hippocampus of normal adult rats. *Neurosci Lett* 182:243-246.
- Gadient RA, Otten UH (1997) Interleukin-6 (IL-6)--a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Prog Neurobiol* 52:379-390.
- Gadient RA, Patterson PH (1999) Leukemia inhibitory factor, Interleukin 6, and other cytokines using the GP130 transducing receptor: roles in inflammation and injury. *Stem Cells* 17:127-137.
- Galiano M, Liu ZQ, Kalla R, Bohatschek M, Koppius A, Gschwendtner A, Xu S, Werner A, Kloss CU, Jones LL, Bluethmann H, Raivich G (2001) Interleukin-6 (IL6) and cellular response to facial nerve injury: effects on lymphocyte recruitment, early microglial activation and axonal outgrowth in IL6-deficient mice. *Eur J Neurosci* 14:327-341.
- Garrison CJ, Dougherty PM, Kajander KC, Carlton SM (1991) Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. *Brain Res* 565:1-7.
- Gong QJ, Li YY, Xin WJ, Zang Y, Ren WJ, Wei XH, Li YY, Zhang T, Liu XG (2008) ATP induces long-term potentiation of C-fiber-evoked field potentials in spinal dorsal horn: The roles of P2X(4) receptors and p38 MAPK in microglia. *Glia*.
- Gosselin RD, Varela C, Banisadr G, Mechighel P, Rostene W, Kitabgi P, Melik-Parsadaniantz S (2005) Constitutive expression of CCR2 chemokine receptor and inhibition by MCP-1/CCL2 of GABA-induced currents in spinal cord neurones. *J Neurochem* 95:1023-1034.

- Gracely RH, Lynch SA, Bennett GJ (1992) Painful neuropathy: altered central processing maintained dynamically by peripheral input. *Pain* 51:175-194.
- Griffin RS, Costigan M, Brenner GJ, Ma CH, Scholz J, Moss A, Allchorne AJ, Stahl GL, Woolf CJ (2007) Complement induction in spinal cord microglia results in anaphylatoxin C5a-mediated pain hypersensitivity. *J Neurosci* 27:8699-8708.
- Grothe C, Heese K, Meisinger C, Wewetzer K, Kunz D, Cattini P, Otten U (2000) Expression of interleukin-6 and its receptor in the sciatic nerve and cultured Schwann cells: relation to 18-kD fibroblast growth factor-2. *Brain Res* 885:172-181.
- Guillemin GJ, Brew BJ (2004) Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J Leukoc Biol* 75:388-397.
- Guirimand F, Le Bars D (1996) [Physiology of nociception]. *Ann Fr Anesth Reanim* 15:1048-1079.
- Gureje O (2008) Comorbidity of pain and anxiety disorders. *Curr Psychiatry Rep* 10:318-322.
- Guschin D, Rogers N, Briscoe J, Witthuhn B, Watling D, Horn F, Pellegrini S, Yasukawa K, Heinrich P, Stark GR, et al. (1995) A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. *Embo J* 14:1421-1429.
- Haan S, Ferguson P, Sommer U, Hiremath M, McVicar DW, Heinrich PC, Johnston JA, Cacalano NA (2003) Tyrosine phosphorylation disrupts elongin interaction and accelerates SOCS3 degradation. *J Biol Chem* 278:31972-31979.
- Hanisch UK (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40:140-155.
- Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10:1387-1394.
- Hanz S, Perlson E, Willis D, Zheng JQ, Massarwa R, Huerta JJ, Koltzenburg M, Kohler M, van-Minnen J, Twiss JL, Fainzilber M (2003) Axoplasmic importins enable retrograde injury signaling in lesioned nerve. *Neuron* 40:1095-1104.
- Hao S, Mata M, Glorioso JC, Fink DJ (2007) Gene transfer to interfere with TNFalpha signaling in neuropathic pain. *Gene Ther* 14:1010-1016.
- Hartner A, Goppelt-Strube M, Hocke GM, Sterzel RB (1997) Differential regulation of chemokines by leukemia inhibitory factor, interleukin-6 and oncostatin M. *Kidney Int* 51:1754-1760.
- Harvey J (2007) Leptin regulation of neuronal excitability and cognitive function. *Curr Opin Pharmacol* 7:643-647.
- He B, You L, Uematsu K, Matsangou M, Xu Z, He M, McCormick F, Jablons DM (2003) Cloning and characterization of a functional promoter of the human SOCS-3 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 301:386-391.
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374:1-20.
- Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334 (Pt 2):297-314.
- Heinricher MM, McGaraughty S, Tortorici V (2001) Circuitry underlying antinociceptive actions of cholecystokinin within the rostral ventromedial medulla. *J Neurophysiol* 85:280-286.

- Hensellek S, Brell P, Schaible HG, Brauer R, Segond von Banchet G (2007) The cytokine TNF α increases the proportion of DRG neurones expressing the TRPV1 receptor via the TNFR1 receptor and ERK activation. *Mol Cell Neurosci* 36:381-391.
- Herrmann JE, Imura T, Song B, Qi J, Ao Y, Nguyen TK, Korsak RA, Takeda K, Akira S, Sofroniew MV (2008) STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J Neurosci* 28:7231-7243.
- Holmes FE, Arnott N, Vanderplank P, Kerr NC, Longbrake EE, Popovich PG, Imai T, Combadiere C, Murphy PM, Wynick D (2008) Intra-neural administration of fractalkine attenuates neuropathic pain-related behaviour. *J Neurochem* 106:640-649.
- Hu J, Mata M, Hao S, Zhang G, Fink DJ (2004) Central sprouting of uninjured small fiber afferents in the adult rat spinal cord following spinal nerve ligation. *Eur J Neurosci* 20:1705-1712.
- Huang C, Ma R, Sun S, Wei G, Fang Y, Liu R, Li G (2008) JAK2-STAT3 signaling pathway mediates thrombin-induced proinflammatory actions of microglia in vitro. *J Neuroimmunol* 204:118-125.
- Hughes DI, Scott DT, Todd AJ, Riddell JS (2003) Lack of evidence for sprouting of A β afferents into the superficial laminae of the spinal cord dorsal horn after nerve section. *J Neurosci* 23:9491-9499.
- Ikeda T, Sato K, Kuwada N, Matsumura T, Yamashita T, Kimura F, Hatake K, Ikeda K, Motoyoshi K (2002) Interleukin-10 differently regulates monocyte chemoattractant protein-1 gene expression depending on the environment in a human monoblastic cell line, UG3. *J Leukoc Biol* 72:1198-1205.
- Ilangumaran S, Ramanathan S, Rottapel R (2004) Regulation of the immune system by SOCS family adaptor proteins. *Semin Immunol* 16:351-365.
- Inoue K (2002) Microglial activation by purines and pyrimidines. *Glia* 40:156-163.
- Inoue K, Tsuda M, Tozaki-Saitoh H (2007) Modification of neuropathic pain sensation through microglial ATP receptors. *Purinergic Signal* 3:311-316.
- Immke DC, Gavva NR (2006) The TRPV1 receptor and nociception. *Semin Cell Dev Biol* 17:582-591.
- Irandoust MI, Aarts LH, Roovers O, Gits J, Erkeland SJ, Touw IP (2007) Suppressor of cytokine signaling 3 controls lysosomal routing of G-CSF receptor. *Embo J* 26:1782-1793.
- Ito Y, Yamamoto M, Li M, Doyu M, Tanaka F, Mutch T, Mitsuma T, Sobue G (1998) Differential temporal expression of mRNAs for ciliary neurotrophic factor (CNTF), leukemia inhibitory factor (LIF), interleukin-6 (IL-6), and their receptors (CNTFR α , LIFR β , IL-6R α and gp130) in injured peripheral nerves. *Brain Res* 793:321-327.
- Jagodic MM, Pathirathna S, Joksovic PM, Lee W, Nelson MT, Naik AK, Su P, Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM (2008) Upregulation of the T-type calcium current in small rat sensory neurons after chronic constrictive injury of the sciatic nerve. *J Neurophysiol* 99:3151-3156.
- Ji GC, Zhang YQ, Ma F, Wu GC (2002) Increase of nociceptive threshold induced by intrathecal injection of interleukin-1 β in normal and carrageenan inflammatory rat. *Cytokine* 19:31-36.
- Ji RR, Gereau RWt, Malcangio M, Strichartz GR (2008) MAP kinase and pain. *Brain Res Rev*.

- Ji RR, Suter MR (2007) p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain. *Mol Pain* 3:33.
- Ji RR, Kawasaki Y, Zhuang ZY, Wen YR, Decosterd I (2006) Possible role of spinal astrocytes in maintaining chronic pain sensitization: review of current evidence with focus on bFGF/JNK pathway. *Neuron Glia Biol* 2:259-269.
- Jin SX, Zhuang ZY, Woolf CJ, Ji RR (2003) p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. *J Neurosci* 23:4017-4022.
- Jin X, Gereau RWt (2006) Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor-alpha. *J Neurosci* 26:246-255.
- Jo D, Liu D, Yao S, Collins RD, Hawiger J (2005) Intracellular protein therapy with SOCS3 inhibits inflammation and apoptosis. *Nat Med* 11:892-898.
- Johnston JA (2004) Are SOCS suppressors, regulators, and degraders? *J Leukoc Biol* 75:743-748.
- Jordan M, Otterness IG, Ng R, Gessner A, Rollinghoff M, Beuscher HU (1995) Neutralization of endogenous IL-6 suppresses induction of IL-1 receptor antagonist. *J Immunol* 154:4081-4090.
- Jou I, Lee JH, Park SY, Yoon HJ, Joe EH, Park EJ (2006) Gangliosides trigger inflammatory responses via TLR4 in brain glia. *Am J Pathol* 168:1619-1630.
- Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413:203-210.
- Junger H, Sorkin LS (2000) Nociceptive and inflammatory effects of subcutaneous TNFalpha. *Pain* 85:145-151.
- Karwacki Z, Kowianski P, Dziewiatkowski J, Domaradzka-Pytel B, Ludkiewicz B, Wojcik S, Narkiewicz O, Morys J (2005) The influence of sevoflurane on the reactivity of astrocytes in the course of the experimental intracerebral haemorrhage in rat. *J Physiol Pharmacol* 56:455-469.
- Kauppila T, Xu XJ (1996) Sciatic nerve section induces mechanical hyperalgesia in skin adjacent to the deafferented region in rats: lack of correlation with autotomy behavior. *Neurosci Lett* 211:65-67.
- Kawasaki Y, Zhang L, Cheng JK, Ji RR (2008) Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *J Neurosci* 28:5189-5194.
- Keay KA, Monassi CR, Levison DB, Bandler R (2004) Peripheral nerve injury evokes disabilities and sensory dysfunction in a subpopulation of rats: a closer model to human chronic neuropathic pain? *Neurosci Lett* 361:188-191.
- Kielian T (2008) Glial connexins and gap junctions in CNS inflammation and disease. *J Neurochem* 106:1000-1016.
- Kile BT, Schulman BA, Alexander WS, Nicola NA, Martin HM, Hilton DJ (2002) The SOCS box: a tale of destruction and degradation. *Trends Biochem Sci* 27:235-241.
- Kim D, Kim MA, Cho IH, Kim MS, Lee S, Jo EK, Choi SY, Park K, Kim JS, Akira S, Na HS, Oh SB, Lee SJ (2007) A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity. *J Biol Chem* 282:14975-14983.

- Kim DH, Cho IH, Kim HS, Jung JE, Kim JE, Lee KH, Park T, Yang YM, Seong SY, Ye SK, Chung MH (2006) Anti-inflammatory effects of 8-hydroxydeoxyguanosine in LPS-induced microglia activation: suppression of STAT3-mediated intercellular adhesion molecule-1 expression. *Exp Mol Med* 38:417-427.
- Kim H, Baumann H (1999) Dual signaling role of the protein tyrosine phosphatase SHP-2 in regulating expression of acute-phase plasma proteins by interleukin-6 cytokine receptors in hepatic cells. *Mol Cell Biol* 19:5326-5338.
- Kim HJ, Na HS, Back SK, Hong SK (2001) Sympathetic sprouting in sensory ganglia depends on the number of injured neurons. *Neuroreport* 12:3529-3532.
- Kim HJ, Na HS, Sung B, Nam HJ, Chung YJ, Hong SK (1999) Is sympathetic sprouting in the dorsal root ganglia responsible for the production of neuropathic pain in a rat model? *Neurosci Lett* 269:103-106.
- Kim HY, Park EJ, Joe EH, Jou I (2003) Curcumin suppresses Janus kinase-STAT inflammatory signaling through activation of Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 2 in brain microglia. *J Immunol* 171:6072-6079.
- Kim NH, Lee MY, Park SJ, Choi JS, Oh MK, Kim IS (2007) Auranofin blocks interleukin-6 signalling by inhibiting phosphorylation of JAK1 and STAT3. *Immunology* 122:607-614.
- Kim OS, Park EJ, Joe EH, Jou I (2002) JAK-STAT signaling mediates gangliosides-induced inflammatory responses in brain microglial cells. *J Biol Chem* 277:40594-40601.
- Kim SH, Chung JM (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50:355-363.
- King T, Rao S, Vanderah T, Chen Q, Vardanyan A, Porreca F (2006) Differential blockade of nerve injury-induced shift in weight bearing and thermal and tactile hypersensitivity by milnacipran. *J Pain* 7:513-520.
- Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW (2002) Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285:1-24.
- Klein MA, Moller JC, Jones LL, Bluethmann H, Kreutzberg GW, Raivich G (1997) Impaired neuroglial activation in interleukin-6 deficient mice. *Glia* 19:227-233.
- Koch A, Zacharowski K, Boehm O, Stevens M, Lipfert P, von Giesen HJ, Wolf A, Freynhagen R (2007) Nitric oxide and pro-inflammatory cytokines correlate with pain intensity in chronic pain patients. *Inflamm Res* 56:32-37.
- Kohno T, Wang H, Amaya F, Brenner GJ, Cheng JK, Ji RR, Woolf CJ (2008) Bradykinin enhances AMPA and NMDA receptor activity in spinal cord dorsal horn neurons by activating multiple kinases to produce pain hypersensitivity. *J Neurosci* 28:4533-4540.
- Kontinen VS, Meert TF (2003) Predictive validity of neuropathic pain models in pharmacological studies with a behavioural outcome in the rat: a systematic review. In: *Proceedings of the 10th World Congress on Pain*. (Dostrovsky JO, Carr DB, Koltzenburgal M, eds), pp 489-498. Seattle, W.A.: IASP Press.
- Korn T, Magnus T, Jung S (2005) Autoantigen specific T cells inhibit glutamate uptake in astrocytes by decreasing expression of astrocytic glutamate transporter GLAST: a mechanism mediated by tumor necrosis factor-alpha. *Faseb J* 19:1878-1880.
- Kovelowski CJ, Ossipov MH, Sun H, Lai J, Malan TP, Porreca F (2000) Supraspinal cholecystokinin may drive tonic descending facilitation mechanisms to maintain neuropathic pain in the rat. *Pain* 87:265-273.

- Krebs DL, Hilton DJ (2001) SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* 19:378-387.
- Kress M (2009) The role of interleukin 6 (IL-6) and its signal transducer gp130 in pathological pain. In: 29th EWCBR. Les Ménuires (France).
- Kurek JB, Austin L, Cheema SS, Bartlett PF, Murphy M (1996) Up-regulation of leukemia inhibitory factor and interleukin-6 in transected sciatic nerve and muscle following denervation. *Neuromuscul Disord* 6:105-114.
- Kushima Y, Hatanaka H (1992) Interleukin-6 and leukemia inhibitory factor promote the survival of acetylcholinesterase-positive neurons in culture from embryonic rat spinal cord. *Neurosci Lett* 143:110-114.
- Kuwabara Y, Yokoyama A, Yang L, Toku K, Mori K, Takeda I, Shigekawa T, Zhang B, Maeda N, Sakanaka M, Tanaka J (2003) Two populations of microglial cells isolated from rat primary mixed glial cultures. *J Neurosci Res* 73:22-30.
- Lai AY, Todd KG (2006) Microglia in cerebral ischemia: molecular actions and interactions. *Can J Physiol Pharmacol* 84:49-59.
- Lai AY, Todd KG (2008) Differential regulation of trophic and proinflammatory microglial effectors is dependent on severity of neuronal injury. *Glia* 56:259-270.
- Lang R, Pauleau AL, Parganas E, Takahashi Y, Mages J, Ihle JN, Rutschman R, Murray PJ (2003) SOCS3 regulates the plasticity of gp130 signaling. *Nat Immunol* 4:546-550.
- Lara-Ramirez R, Segura-Anaya E, Martinez-Gomez A, Dent MA (2008) Expression of interleukin-6 receptor alpha in normal and injured rat sciatic nerve. *Neuroscience* 152:601-608.
- Latrémolière A, Mauborgne A, Masson J, Bourgoin S, Kayser V, Hamon M, Pohl M (2008) Differential implication of proinflammatory cytokine interleukin-6 in the development of cephalic versus extracephalic neuropathic pain in rats. *J Neurosci* 28:8489-8501.
- Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM (1979) Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. *Pain* 6:283-304.
- Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM (1979) Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). II. Lack of effect on non-convergent neurones, supraspinal involvement and theoretical implications. *Pain* 6:305-327.
- Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW (2001) Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 53:597-652.
- Ledeboer A, Sloane EM, Milligan ED, Frank MG, Mahony JH, Maier SF, Watkins LR (2005) Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain* 115:71-83.
- Lee HK, Seo IA, Suh DJ, Hong JI, Yoo YH, Park HT (2009) Interleukin-6 is required for the early induction of glial fibrillary acidic protein in Schwann cells during Wallerian degeneration. *J Neurochem* 108:776-786.
- Lee HL, Lee KM, Son SJ, Hwang SH, Cho HJ (2004) Temporal expression of cytokines and their receptors mRNAs in a neuropathic pain model. *Neuroreport* 15:2807-2811.
- Lee JW, Siegel SM, Oaklander AL (2009) Effects of distal nerve injuries on dorsal-horn neurons and glia: Relationships between lesion size and mechanical hyperalgesia. *Neuroscience* 158:904-914.

- Lee KH, Moon KJ, Kim HS, Yoo BC, Park S, Lee H, Kwon S, Lee ES, Yoon S (2008) Increased cytoplasmic levels of CIS, SOCS1, SOCS2, or SOCS3 are required for nuclear translocation. *FEBS Lett* 582:2319-2324.
- Lee N, Neitzel KL, Devlin BK, MacLennan AJ (2004) STAT3 phosphorylation in injured axons before sensory and motor neuron nuclei: potential role for STAT3 as a retrograde signaling transcription factor. *J Comp Neurol* 474:535-545.
- Lehmann U, Schmitz J, Weissenbach M, Sobota RM, Hortner M, Friederichs K, Behrmann I, Tsiaris W, Sasaki A, Schneider-Mergener J, Yoshimura A, Neel BG, Heinrich PC, Schaper F (2003) SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130. *J Biol Chem* 278:661-671.
- Levy DE, Darnell JE, Jr. (2002) Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:651-662.
- Li CX, Jing YL, Xie YK (2007) Glycosylation-induced depolarization facilitates subthreshold membrane oscillation in injured primary sensory neurons. *Brain Res* 1139:201-209.
- Lim G, Wang S, Zhang Y, Tian Y, Mao J (2009) Spinal leptin contributes to the pathogenesis of neuropathic pain in rodents. *J Clin Invest*.
- Lindenlaub T, Sommer C (2003) Cytokines in sural nerve biopsies from inflammatory and non-inflammatory neuropathies. *Acta Neuropathol* 105:593-602.
- Liu B, Li H, Brull SJ, Zhang JM (2002) Increased sensitivity of sensory neurons to tumor necrosis factor alpha in rats with chronic compression of the lumbar ganglia. *J Neurophysiol* 88:1393-1399.
- Liu CN, Wall PD, Ben-Dor E, Michaelis M, Amir R, Devor M (2000) Tactile allodynia in the absence of C-fiber activation: altered firing properties of DRG neurons following spinal nerve injury. *Pain* 85:503-521.
- Liu E, Cote JF, Vuori K (2003) Negative regulation of FAK signaling by SOCS proteins. *Embo J* 22:5036-5046.
- Liu J, Feng X, Yu M, Xie W, Zhao X, Li W, Guan R, Xu J (2007) Pentoxifylline attenuates the development of hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett* 412:268-272.
- Loeser JD, Melzack R (1999) Pain: an overview. *Lancet* 353:1607-1609.
- Louboutin JP, Agrawal L, Liu B, Strayer DS (2008) In vivo gene transfer to the CNS using recombinant SV40-derived vectors. *Expert Opin Biol Ther* 8:1319-1335.
- Lu VB, Biggs JE, Stebbing MJ, Balasubramanyan S, Todd KG, Lai AY, Colmers WF, Dawbarn D, Ballanyi K, Smith PA (2009) BDNF drives the changes in excitatory synaptic transmission in the rat superficial dorsal horn that follow sciatic nerve injury. *J Physiol*.
- Lu X, Richardson PM (1993) Responses of macrophages in rat dorsal root ganglia following peripheral nerve injury. *J Neurocytol* 22:334-341.
- Lufei C, Koh TH, Uchida T, Cao X (2007) Pin1 is required for the Ser727 phosphorylation-dependent Stat3 activity. *Oncogene* 26:7656-7664.
- Lund IK, Hansen JA, Andersen HS, Moller NP, Billestrup N (2005) Mechanism of protein tyrosine phosphatase 1B-mediated inhibition of leptin signalling. *J Mol Endocrinol* 34:339-351.

- Ma Q, Kobayashi M, Sugiura M, Ozaki N, Nishio K, Shiraishi Y, Furukawa K, Furukawa K, Sugiura Y (2003) Morphological study of disordered myelination and the degeneration of nerve fibers in the spinal cord of mice lacking complex gangliosides. *Arch Histol Cytol* 66:37-44.
- Ma W, Quirion R (2005) Up-regulation of interleukin-6 induced by prostaglandin E from invading macrophages following nerve injury: an in vivo and in vitro study. *J Neurochem* 93:664-673.
- Marchand F, Perretti M, McMahon SB (2005) Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 6:521-532.
- Marz P, Herget T, Lang E, Otten U, Rose-John S (1997) Activation of gp130 by IL-6/soluble IL-6 receptor induces neuronal differentiation. *Eur J Neurosci* 9:2765-2773.
- Masuhira Y, Kayama K, Fukushima A, Baba K, Soutsu M, Kamiya Y, Gotoh M, Yamaguchi N, Hanazawa S (2008) SOCS-3 inhibits E2F/DP-1 transcriptional activity and cell cycle progression via interaction with DP-1. *J Biol Chem* 283:31575-31583.
- Maves TJ, Pechman PS, Gebhart GF, Meller ST (1993) Possible chemical contribution from chronic gut sutures produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 54:57-69.
- McMahon SB, Cafferty WB, Marchand F (2005) Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Exp Neurol* 192:444-462.
- McTigue DM, Tripathi RB (2008) The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *J Neurochem* 107:1-19.
- Melzack R, Wall PD (1965) Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150:971-979.
- Meunier A, Latremoliere A, Dominguez E, Mauborgne A, Philippe S, Hamon M, Mallet J, Benoliel JJ, Pohl M (2007) Lentiviral-mediated targeted NF-kappaB blockade in dorsal spinal cord glia attenuates sciatic nerve injury-induced neuropathic pain in the rat. *Mol Ther* 15:687-697.
- Meunier A, Mauborgne A, Masson J, Mallet J, Pohl M (2008) Lentiviral-mediated targeted transgene expression in dorsal spinal cord glia: Tool for the study of glial cell implication in mechanisms underlying chronic pain development. *J Neurosci Methods* 167:148-159.
- Miao T, Wu D, Zhang Y, Bo X, Subang MC, Wang P, Richardson PM (2006) Suppressor of cytokine signaling-3 suppresses the ability of activated signal transducer and activator of transcription-3 to stimulate neurite growth in rat primary sensory neurons. *J Neurosci* 26:9512-9519.
- Michikawa M, Gong JS, Fan QW, Sawamura N, Yanagisawa K (2001) A novel action of alzheimer's amyloid beta-protein (Abeta): oligomeric Abeta promotes lipid release. *J Neurosci* 21:7226-7235.
- Millan MJ (1999) The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57:1-164.
- Millecamps M, Jourdan D, Leger S, Etienne M, Eschaliere A, Ardid D (2005) Circadian pattern of spontaneous behavior in monoarthritic rats: a novel global approach to evaluation of chronic pain and treatment effectiveness. *Arthritis Rheum* 52:3470-3478.
- Milligan E, Zapata V, Schoeniger D, Chacur M, Green P, Poole S, Martin D, Maier SF, Watkins LR (2005) An initial investigation of spinal mechanisms underlying pain enhancement induced by fractalkine, a neuronally released chemokine. *Eur J Neurosci* 22:2775-2782.

- Milligan ED, Langer SJ, Sloane EM, He L, Wieseler-Frank J, O'Connor K, Martin D, Forsayeth JR, Maier SF, Johnson K, Chavez RA, Leinwand LA, Watkins LR (2005) Controlling pathological pain by adenovirally driven spinal production of the anti-inflammatory cytokine, interleukin-10. *Eur J Neurosci* 21:2136-2148.
- Milligan ED, Mehmert KK, Hinde JL, Harvey LO, Martin D, Tracey KJ, Maier SF, Watkins LR (2000) Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intrathecal administration of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp120. *Brain Res* 861:105-116.
- Milligan ED, Sloane EM, Langer SJ, Cruz PE, Chacur M, Spataro L, Wieseler-Frank J, Hammack SE, Maier SF, Flotte TR, Forsayeth JR, Leinwand LA, Chavez R, Watkins LR (2005) Controlling neuropathic pain by adeno-associated virus driven production of the anti-inflammatory cytokine, interleukin-10. *Mol Pain* 1:9.
- Milligan ED, Sloane EM, Langer SJ, Hughes TS, Jekich BM, Frank MG, Mahoney JH, Levkoff LH, Maier SF, Cruz PE, Flotte TR, Johnson KW, Mahoney MM, Chavez RA, Leinwand LA, Watkins LR (2006) Repeated intrathecal injections of plasmid DNA encoding interleukin-10 produce prolonged reversal of neuropathic pain. *Pain* 126:294-308.
- Milligan ED, Sloane EM, Watkins LR (2008) Glia in pathological pain: a role for fractalkine. *J Neuroimmunol* 198:113-120.
- Milligan ED, Twining C, Chacur M, Biedenkapp J, O'Connor K, Poole S, Tracey K, Martin D, Maier SF, Watkins LR (2003) Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *J Neurosci* 23:1026-1040.
- Milligan ED, Watkins LR (2009) Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 10:23-36.
- Min KJ, Yang MS, Jou I, Joe EH (2004a) Protein kinase A mediates microglial activation induced by plasminogen and gangliosides. *Exp Mol Med* 36:461-467.
- Min KJ, Pyo HK, Yang MS, Ji KA, Jou I, Joe EH (2004b) Gangliosides activate microglia via protein kinase C and NADPH oxidase. *Glia* 48:197-206.
- Miyoshi K, Obata K, Kondo T, Okamura H, Noguchi K (2008) Interleukin-18-mediated microglia/astrocyte interaction in the spinal cord enhances neuropathic pain processing after nerve injury. *J Neurosci* 28:12775-12787.
- Moalem G, Grafe P, Tracey DJ (2005) Chemical mediators enhance the excitability of unmyelinated sensory axons in normal and injured peripheral nerve of the rat. *Neuroscience* 134:1399-1411.
- Moalem G, Tracey DJ (2006) Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res Rev* 51:240-264.
- Moalem G, Xu K, Yu L (2004) T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. *Neuroscience* 129:767-777.
- Mogil JS, Crager SE (2004) What should we be measuring in behavioral studies of chronic pain in animals? *Pain* 112:12-15.
- Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H, Woolf CJ (2002) Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci* 22:6724-6731.

- Morikawa Y, Tamura S, Minehata K, Donovan PJ, Miyajima A, Senba E (2004) Essential function of oncostatin m in nociceptive neurons of dorsal root ganglia. *J Neurosci* 24:1941-1947.
- Mosconi T, Kruger L (1996) Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy: ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations. *Pain* 64:37-57.
- Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady RO, Jr., Linden DJ, Ferris CD, Rogawski MA, Snyder SH (2000) D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4926-4931.
- Murphy PG, Borthwick LS, Johnston RS, Kuchel G, Richardson PM (1999) Nature of the retrograde signal from injured nerves that induces interleukin-6 mRNA in neurons. *J Neurosci* 19:3791-3800.
- Murphy PG, Grondin J, Altares M, Richardson PM (1995) Induction of interleukin-6 in axotomized sensory neurons. *J Neurosci* 15:5130-5138.
- Murphy PG, Ramer MS, Borthwick L, Gauldie J, Richardson PM, Bisby MA (1999) Endogenous interleukin-6 contributes to hypersensitivity to cutaneous stimuli and changes in neuropeptides associated with chronic nerve constriction in mice. *Eur J Neurosci* 11:2243-2253.
- Murray PJ (2006) Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. *Curr Opin Pharmacol* 6:379-386.
- Murray PJ (2007) The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol* 178:2623-2629.
- Myers MP, Andersen JN, Cheng A, Tremblay ML, Horvath CM, Parisien JP, Salmeen A, Barford D, Tonks NK (2001) TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem* 276:47771-47774.
- Na HS, Choi S, Kim J, Park J, Shin HS (2008) Attenuated neuropathic pain in Cav3.1 null mice. *Mol Cells* 25:242-246.
- Nakamura M, Okada S, Toyama Y, Okano H (2005) Role of IL-6 in spinal cord injury in a mouse model. *Clin Rev Allergy Immunol* 28:197-204.
- Narazaki M, Yasukawa K, Saito T, Ohsugi Y, Fukui H, Koishihara Y, Yancopoulos GD, Taga T, Kishimoto T (1993) Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood* 82:1120-1126.
- Navarro X, Vivo M, Valero-Cabre A (2007) Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol* 82:163-201.
- Ni CW, Hsieh HJ, Chao YJ, Wang DL (2004) Interleukin-6-induced JAK2/STAT3 signaling pathway in endothelial cells is suppressed by hemodynamic flow. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C771-780.
- Nicholson SE, De Souza D, Fabri LJ, Corbin J, Willson TA, Zhang JG, Silva A, Asimakis M, Farley A, Nash AD, Metcalf D, Hilton DJ, Nicola NA, Baca M (2000) Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6493-6498.

- Niemand C, Nimmesgern A, Haan S, Fischer P, Schaper F, Rossaint R, Heinrich PC, Muller-Newen G (2003) Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3. *J Immunol* 170:3263-3272.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314-1318.
- Novotny-Diermayr V, Zhang T, Gu L, Cao X (2002) Protein kinase C delta associates with the interleukin-6 receptor subunit glycoprotein (gp) 130 via Stat3 and enhances Stat3-gp130 interaction. *J Biol Chem* 277:49134-49142.
- Obata K, Katsura H, Miyoshi K, Kondo T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Fukuoka T, Akira S, Noguchi K (2008) Toll-like receptor 3 contributes to spinal glial activation and tactile allodynia after nerve injury. *J Neurochem*.
- Obata K, Katsura H, Mizushima T, Sakurai J, Kobayashi K, Yamanaka H, Dai Y, Fukuoka T, Noguchi K (2007) Roles of extracellular signal-regulated protein kinases 5 in spinal microglia and primary sensory neurons for neuropathic pain. *J Neurochem* 102:1569-1584.
- Obata K, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Mizushima T, Katsura H, Fukuoka T, Tokunaga A, Noguchi K (2004) Role of mitogen-activated protein kinase activation in injured and intact primary afferent neurons for mechanical and heat hypersensitivity after spinal nerve ligation. *J Neurosci* 24:10211-10222.
- Obreja O, Biasio W, Andratsch M, Lips KS, Rathee PK, Ludwig A, Rose-John S, Kress M (2005) Fast modulation of heat-activated ionic current by proinflammatory interleukin 6 in rat sensory neurons. *Brain* 128:1634-1641.
- Obreja O, Schmelz M, Poole S, Kress M (2002) Interleukin-6 in combination with its soluble IL-6 receptor sensitises rat skin nociceptors to heat, in vivo. *Pain* 96:57-62.
- Ohtori S, Takahashi K, Moriya H, Myers RR (2004) TNF-alpha and TNF-alpha receptor type 1 upregulation in glia and neurons after peripheral nerve injury: studies in murine DRG and spinal cord. *Spine* 29:1082-1088.
- Okada S, Nakamura M, Mikami Y, Shimazaki T, Mihara M, Ohsugi Y, Iwamoto Y, Yoshizaki K, Kishimoto T, Toyama Y, Okano H (2004) Blockade of interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury. *J Neurosci Res* 76:265-276.
- Okada S, Nakamura M, Katoh H, Miyao T, Shimazaki T, Ishii K, Yamane J, Yoshimura A, Iwamoto Y, Toyama Y, Okano H (2006) Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nat Med* 12:829-834.
- Okamoto K, Martin DP, Schmelzer JD, Mitsui Y, Low PA (2001) Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in rat sciatic nerve chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Exp Neurol* 169:386-391.
- Oprea A, Kress M (2000) Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha, IL-1 beta, and IL-6 but not IL-8 in the development of heat hyperalgesia: effects on heat-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin. *J Neurosci* 20:6289-6293.
- Orellana DI, Quintanilla RA, Gonzalez-Billault C, Maccioni RB (2005) Role of the JAKs/STATs pathway in the intracellular calcium changes induced by interleukin-6 in hippocampal neurons. *Neurotox Res* 8:295-304.

- Orr SJ, Morgan NM, Buick RJ, Boyd CR, Elliott J, Burrows JF, Jefferies CA, Crocker PR, Johnston JA (2007a) SOCS3 targets Siglec 7 for proteasomal degradation and blocks Siglec 7-mediated responses. *J Biol Chem* 282:3418-3422.
- Orr SJ, Morgan NM, Elliott J, Burrows JF, Scott CJ, McVicar DW, Johnston JA (2007b) CD33 responses are blocked by SOCS3 through accelerated proteasomal-mediated turnover. *Blood* 109:1061-1068.
- Orstavik K, Namer B, Schmidt R, Schmelz M, Hilliges M, Weidner C, Carr RW, Handwerker H, Jorum E, Torebjork HE (2006) Abnormal function of C-fibers in patients with diabetic neuropathy. *J Neurosci* 26:11287-11294.
- O'Shea JJ, Murray PJ (2008) Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* 28:477-487.
- Ozog MA, Bernier SM, Bates DC, Chatterjee B, Lo CW, Naus CC (2004) The complex of ciliary neurotrophic factor-ciliary neurotrophic factor receptor alpha up-regulates connexin43 and intercellular coupling in astrocytes via the Janus tyrosine kinase/signal transducer and activator of transcription pathway. *Mol Biol Cell* 15:4761-4774.
- Pachau J, Martin-Caraballo M (2007) Extrinsic regulation of T-type Ca(2+) channel expression in chick nodose ganglion neurons. *Dev Neurobiol* 67:1915-1931.
- Padi SS, Kulkarni SK (2008) Minocycline prevents the development of neuropathic pain, but not acute pain: Possible anti-inflammatory and antioxidant mechanisms. *Eur J Pharmacol* 601:79-87.
- Pandey MK, Sung B, Ahn KS, Aggarwal BB (2008) Butein Suppresses Constitutive and Inducible STAT3 Activation and STAT3-Regulated Gene Products through the Induction of a Protein Tyrosine Phosphatase SHP-1. *Mol Pharmacol*.
- Park JY, Kim HY, Jou I, Park SM (2008) GM1 induces p38 and microtubule dependent ramification of rat primary microglia in vitro. *Brain Res* 1244:13-23.
- Pezet S, Krzyzanowska A, Wong LF, Grist J, Mazarakis ND, Georgievska B, McMahon SB (2006) Reversal of neurochemical changes and pain-related behavior in a model of neuropathic pain using modified lentiviral vectors expressing GDNF. *Mol Ther* 13:1101-1109.
- Pieraut S, Laurent-Matha V, Sar C, Hubert T, Mechaly I, Hilaire C, Mersel M, Delpire E, Valmier J, Scamps F (2007) NKCC1 phosphorylation stimulates neurite growth of injured adult sensory neurons. *J Neurosci* 27:6751-6759.
- Pieraut S, Valmier J, Scamps F (2008) Implication of the JAK/STAT pathway in the regulation of the chloride homeostasis in axotomized sensory neurons. In: FENS 2008. Geneva (Swiss).
- Piessevaux J, Lavens D, Peelman F, Tavernier J (2008) The many faces of the SOCS box. *Cytokine Growth Factor Rev*.
- Pizzi M, Sarnico I, Boroni F, Benarese M, Dreano M, Garotta G, Valerio A, Spano P (2004) Prevention of neuron and oligodendrocyte degeneration by interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor/IL-6 fusion protein in organotypic hippocampal slices. *Mol Cell Neurosci* 25:301-311.
- Pocock JM, Kettenmann H (2007) Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci* 30:527-535.

- Porreca F, Ossipov MH, Gebhart GF (2002) Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends Neurosci* 25:319-325.
- Porter JT, McCarthy KD (1997) Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog Neurobiol* 51:439-455.
- Pyo H, Joe E, Jung S, Lee SH, Jou I (1999) Gangliosides activate cultured rat brain microglia. *J Biol Chem* 274:34584-34589.
- Qiu J, Cafferty WB, McMahon SB, Thompson SW (2005) Conditioning injury-induced spinal axon regeneration requires signal transducer and activator of transcription 3 activation. *J Neurosci* 25:1645-1653.
- Raghavendra V, Tanga F, DeLeo JA (2003) Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther* 306:624-630.
- Rahman W, D'Mello R, Dickenson AH (2008) Peripheral nerve injury-induced changes in spinal alpha(2)-adrenoceptor-mediated modulation of mechanically evoked dorsal horn neuronal responses. *J Pain* 9:350-359.
- Raineteau O (2008) Plastic responses to spinal cord injury. *Behav Brain Res* 192:114-123.
- Rakesh K, Agrawal DK (2005) Controlling cytokine signaling by constitutive inhibitors. *Biochem Pharmacol* 70:649-657.
- Ramer MS, Murphy PG, Richardson PM, Bisby MA (1998) Spinal nerve lesion-induced mechanoallodynia and adrenergic sprouting in sensory ganglia are attenuated in interleukin-6 knockout mice. *Pain* 78:115-121.
- Ramos KM, Maier SF, Watkins LR (2008) Are astrocytes and microglia the only non-neuronal cells responsive to pain-enhancing substances? Clues from endothelial cells and oligodendrocytes. In: International Association for the Study of Pain World Congress, 2008. Glasgow, Scotland.
- Reeve AJ, Patel S, Fox A, Walker K, Urban L (2000) Intrathecally administered endotoxin or cytokines produce allodynia, hyperalgesia and changes in spinal cord neuronal responses to nociceptive stimuli in the rat. *Eur J Pain* 4:247-257.
- Ribeiro-Resende VT, Oliveira-Silva A, Ouverney-Brandao S, Santiago MF, Hedin-Pereira C, Mendez-Otero R (2007) Ganglioside 9-O-acetyl GD3 expression is upregulated in the regenerating peripheral nerve. *Neuroscience* 147:97-105.
- Richebe P, Rivat C, Laulin JP, Maurette P, Simonnet G (2005) Ketamine improves the management of exaggerated postoperative pain observed in perioperative fentanyl-treated rats. *Anesthesiology* 102:421-428.
- Rivat C, Richebe P, Laboureyras E, Laulin JP, Havouis R, Noble F, Moulinoux JP, Simonnet G (2008) Polyamine deficient diet to relieve pain hypersensitivity. *Pain* 137:125-137.
- Rodriguez Parkitna J, Korostynski M, Kaminska-Chowaniec D, Obara I, Mika J, Przewlocka B, Przewlocki R (2006) Comparison of gene expression profiles in neuropathic and inflammatory pain. *J Physiol Pharmacol* 57:401-414.
- Rohl C, Lucius R, Sievers J (2007) The effect of activated microglia on astrogliosis parameters in astrocyte cultures. *Brain Res* 1129:43-52.
- Ronn SG, Borjesson A, Bruun C, Heding PE, Frobose H, Mandrup-Poulsen T, Karlsen AE, Rasschaert J, Sandler S, Billestrup N (2008) Suppressor of cytokine signalling-3 expression

- inhibits cytokine-mediated destruction of primary mouse and rat pancreatic islets and delays allograft rejection. *Diabetologia* 51:1873-1882.
- Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA (2006) Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol* 80:227-236.
- Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S, White MF (2002) SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem* 277:42394-42398.
- Ruitenbergh MJ, Eggers R, Boer GJ, Verhaagen J (2002) Adeno-associated viral vectors as agents for gene delivery: application in disorders and trauma of the central nervous system. *Methods* 28:182-194.
- Rummel C, Sachot C, Poole S, Luheshi GN (2006) Circulating interleukin-6 induces fever through a STAT3-linked activation of COX-2 in the brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291:R1316-1326.
- Salemi S, Rethage J, Wollina U, Michel BA, Gay RE, Gay S, Sprott H (2003) Detection of interleukin 1beta (IL-1beta), IL-6, and tumor necrosis factor-alpha in skin of patients with fibromyalgia. *J Rheumatol* 30:146-150.
- Sallmann S, Juttler E, Prinz S, Petersen N, Knopf U, Weiser T, Schwaninger M (2000) Induction of interleukin-6 by depolarization of neurons. *J Neurosci* 20:8637-8642.
- Sanz E, Hofer MJ, Unzeta M, Campbell IL (2008) Minimal role for STAT1 in interleukin-6 signaling and actions in the murine brain. *Glia* 56:190-199.
- Sasaki A, Inagaki-Ohara K, Yoshida T, Yamanaka A, Sasaki M, Yasukawa H, Koromilas AE, Yoshimura A (2003) The N-terminal truncated isoform of SOCS3 translated from an alternative initiation AUG codon under stress conditions is stable due to the lack of a major ubiquitination site, Lys-6. *J Biol Chem* 278:2432-2436.
- Satriotomo I, Bowen KK, Vemuganti R (2006) JAK2 and STAT3 activation contributes to neuronal damage following transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem* 98:1353-1368.
- Scemes E, Giaume C (2006) Astrocyte calcium waves: what they are and what they do. *Glia* 54:716-725.
- Schäfers M, Brinkhoff J, Neukirchen S, Marziniak M, Sommer C (2001) Combined epineurial therapy with neutralizing antibodies to tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 receptor has an additive effect in reducing neuropathic pain in mice. *Neurosci Lett* 310:113-116.
- Schäfers M, Geis C, Brors D, Yaksh TL, Sommer C (2002) Anterograde transport of tumor necrosis factor-alpha in the intact and injured rat sciatic nerve. *J Neurosci* 22:536-545.
- Schäfers M, Sorkin L (2008) Effect of cytokines on neuronal excitability. *Neurosci Lett* 437:188-193.
- Schäfers M, Svensson CI, Sommer C, Sorkin LS (2003) Tumor necrosis factor-alpha induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons. *J Neurosci* 23:2517-2521.
- Schaper F, Gendo C, Eck M, Schmitz J, Grimm C, Anhof D, Kerr IM, Heinrich PC (1998) Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression. *Biochem J* 335 (Pt 3):557-565.

- Schmitz J, Dahmen H, Grimm C, Gendo C, Muller-Newen G, Heinrich PC, Schaper F (2000) The cytoplasmic tyrosine motifs in full-length glycoprotein 130 have different roles in IL-6 signal transduction. *J Immunol* 164:848-854.
- Schmitz J, Weissenbach M, Haan S, Heinrich PC, Schaper F (2000) SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J Biol Chem* 275:12848-12856.
- Schobitz B, de Kloet ER, Sutanto W, Holsboer F (1993) Cellular localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *Eur J Neurosci* 5:1426-1435.
- Scholz J, Broom DC, Youn DH, Mills CD, Kohno T, Suter MR, Moore KA, Decosterd I, Coggeshall RE, Woolf CJ (2005) Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 25:7317-7323.
- Scholz J, Woolf CJ (2002) Can we conquer pain? *Nat Neurosci* 5 Suppl:1062-1067.
- Scholz J, Woolf CJ (2007) The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci* 10:1361-1368.
- Schweizer U, Gunnarsen J, Karch C, Wiese S, Holtmann B, Takeda K, Akira S, Sendtner M (2002) Conditional gene ablation of Stat3 reveals differential signaling requirements for survival of motoneurons during development and after nerve injury in the adult. *J Cell Biol* 156:287-297.
- Sehgal PB (2008) Paradigm shifts in the cell biology of STAT signaling. *Semin Cell Dev Biol* 19:329-340.
- Seltzer Z, Dubner R, Shir Y (1990) A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43:205-218.
- Shamash S, Reichert F, Rotshenker S (2002) The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta. *J Neurosci* 22:3052-3060.
- Sheu JY, Kulhanek DJ, Eckenstein FP (2000) Differential patterns of ERK and STAT3 phosphorylation after sciatic nerve transection in the rat. *Exp Neurol* 166:392-402.
- Shouda T, Yoshida T, Hanada T, Wakioka T, Oishi M, Miyoshi K, Komiyama S, Kosai K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Nagata K, Yoshimura A (2001) Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 108:1781-1788.
- Shubayev VI, Myers RR (2002) Anterograde TNF alpha transport from rat dorsal root ganglion to spinal cord and injured sciatic nerve. *Neurosci Lett* 320:99-101.
- Shuto T, Horie H, Hikawa N, Sango K, Tokashiki A, Murata H, Yamamoto I, Ishikawa Y (2001) IL-6 up-regulates CNTF mRNA expression and enhances neurite regeneration. *Neuroreport* 12:1081-1085.
- Siewert E, Muller-Esterl W, Starr R, Heinrich PC, Schaper F (1999) Different protein turnover of interleukin-6-type cytokine signalling components. *Eur J Biochem* 265:251-257.
- Sindrup SH, Jensen TS (1999) Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: an update and effect related to mechanism of drug action. *Pain* 83:389-400.

- Sitcheran R, Gupta P, Fisher PB, Baldwin AS (2005) Positive and negative regulation of EAAT2 by NF-kappaB: a role for N-myc in TNFalpha-controlled repression. *Embo J* 24:510-520.
- Sitko JC, Guevara CI, Cacalano NA (2004) Tyrosine-phosphorylated SOCS3 interacts with the Nck and Crk-L adapter proteins and regulates Nck activation. *J Biol Chem* 279:37662-37669.
- Sitko JC, Yeh B, Kim M, Zhou H, Takaesu G, Yoshimura A, McBride WH, Jewett A, Jamieson CA, Cacalano NA (2008) SOCS3 regulates p21 expression and cell cycle arrest in response to DNA damage. *Cell Signal* 20:2221-2230.
- Slaets H, Dumont D, Vanderlocht J, Noben JP, Leprince P, Robben J, Hendriks J, Stinissen P, Hellings N (2008) Leukemia inhibitory factor induces an antiapoptotic response in oligodendrocytes through Akt-phosphorylation and up-regulation of 14-3-3. *Proteomics* 8:1237-1247.
- Sobota RM, Muller PJ, Khouri C, Ullrich A, Poli V, Noguchi T, Heinrich PC, Schaper F (2008) SHPS-1/SIRP1alpha contributes to interleukin-6 signalling. *Cell Signal* 20:1385-1391.
- Sofroniew MV (2005) Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist* 11:400-407.
- Sommer C, Kress M (2004) Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett* 361:184-187.
- Sommer C, Petrasch S, Lindenlaub T, Toyka KV (1999) Neutralizing antibodies to interleukin 1-receptor reduce pain associated behavior in mice with experimental neuropathy. *Neurosci Lett* 270:25-28.
- Sriram K, Benkovic SA, Hebert MA, Miller DB, O'Callaghan JP (2004) Induction of gp130-related cytokines and activation of JAK2/STAT3 pathway in astrocytes precedes up-regulation of glial fibrillary acidic protein in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of neurodegeneration: key signaling pathway for astrogliosis in vivo? *J Biol Chem* 279:19936-19947.
- Staples KJ, Smallie T, Williams LM, Foey A, Burke B, Foxwell BM, Ziegler-Heitbrock L (2007) IL-10 induces IL-10 in primary human monocyte-derived macrophages via the transcription factor Stat3. *J Immunol* 178:4779-4785.
- Streit WJ, Hurley SD, McGraw TS, Semple-Rowland SL (2000) Comparative evaluation of cytokine profiles and reactive gliosis supports a critical role for interleukin-6 in neuron-glia signaling during regeneration. *J Neurosci Res* 61:10-20.
- Sugiura S, Lahav R, Han J, Kou SY, Banner LR, de Pablo F, Patterson PH (2000) Leukaemia inhibitory factor is required for normal inflammatory responses to injury in the peripheral and central nervous systems in vivo and is chemotactic for macrophages in vitro. *Eur J Neurosci* 12:457-466.
- Sung B, Lim G, Mao J (2003) Altered expression and uptake activity of spinal glutamate transporters after nerve injury contribute to the pathogenesis of neuropathic pain in rats. *J Neurosci* 23:2899-2910.
- Sung CS, Wen ZH, Chang WK, Ho ST, Tsai SK, Chang YC, Wong CS (2004) Intrathecal interleukin-1beta administration induces thermal hyperalgesia by activating inducible nitric oxide synthase expression in the rat spinal cord. *Brain Res* 1015:145-153.

- Suter MR, Wen YR, Decosterd I, Ji RR (2007) Do glial cells control pain? *Neuron Glia Biol* 3:255-268.
- Suzuki R, Rygh LJ, Dickenson AH (2004) Bad news from the brain: descending 5-HT pathways that control spinal pain processing. *Trends Pharmacol Sci* 25:613-617.
- Svensson CI, Schafers M, Jones TL, Powell H, Sorkin LS (2005) Spinal blockade of TNF blocks spinal nerve ligation-induced increases in spinal P-p38. *Neurosci Lett* 379:209-213.
- Sweitzer S, Martin D, DeLeo JA (2001) Intrathecal interleukin-1 receptor antagonist in combination with soluble tumor necrosis factor receptor exhibits an anti-allodynic action in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience* 103:529-539.
- Sweitzer SM, White KA, Dutta C, DeLeo JA (2002) The differential role of spinal MHC class II and cellular adhesion molecules in peripheral inflammatory versus neuropathic pain in rodents. *J Neuroimmunol* 125:82-93.
- Taga T, Kishimoto T (1997) Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 15:797-819.
- Takeda M, Takahashi M, Matsumoto S (2009) Contribution of the activation of satellite glia in sensory ganglia to pathological pain. *Neurosci Biobehav Rev*.
- Takizawa T, Yanagisawa M, Ochiai W, Yasukawa K, Ishiguro T, Nakashima K, Taga T (2001) Directly linked soluble IL-6 receptor-IL-6 fusion protein induces astrocyte differentiation from neuroepithelial cells via activation of STAT3. *Cytokine* 13:272-279.
- Tanga FY, Natile-McMenemy N, DeLeo JA (2005) The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5856-5861.
- Tanga FY, Raghavendra V, DeLeo JA (2004) Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain. *Neurochem Int* 45:397-407.
- Tanga FY, Raghavendra V, Natile-McMenemy N, Marks A, Deleo JA (2006) Role of astrocytic S100beta in behavioral hypersensitivity in rodent models of neuropathic pain. *Neuroscience* 140:1003-1010.
- Teles RM, Antunes SL, Jardim MR, Oliveira AL, Nery JA, Sales AM, Sampaio EP, Shubayev V, Sarno EN (2007) Expression of metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, and TACE) and TNF-alpha in the nerves of leprosy patients. *J Peripher Nerv Syst* 12:195-204.
- Thacker MA, Clark AK, Bishop T, Grist J, Yip PK, Moon LD, Thompson SW, Marchand F, McMahon SB (2008) CCL2 is a key mediator of microglia activation in neuropathic pain states. *Eur J Pain*.
- Thompson SW, Priestley JV, Southall A (1998) gp130 cytokines, leukemia inhibitory factor and interleukin-6, induce neuropeptide expression in intact adult rat sensory neurons in vivo: time-course, specificity and comparison with sciatic nerve axotomy. *Neuroscience* 84:1247-1255.
- Tilg H, Dinarello CA, Mier JW (1997) IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunol Today* 18:428-432.
- Trimarchi T, Pachuau J, Shepherd A, Dey D, Martin-Caraballo M (2009) CNTF-evoked activation of JAK and ERK mediates the functional expression of T-type Ca²⁺ channels in chicken nodose neurons. *J Neurochem* 108:246-259.

- Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, Inoue K (2003) P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424:778-783.
- Tawfik VL, Nutile-McMenemy N, Lacroix-Fralish ML, Deleo JA (2007) Efficacy of propentofylline, a glial modulating agent, on existing mechanical allodynia following peripheral nerve injury. *Brain Behav Immun* 21:238-246.
- Uceyler N, Rogausch JP, Toyka KV, Sommer C (2007) Differential expression of cytokines in painful and painless neuropathies. *Neurology* 69:42-49.
- Uceyler N, Sommer C (2008) Cytokine regulation in animal models of neuropathic pain and in human diseases. *Neurosci Lett* 437:194-198.
- Ueda H (2008) Peripheral mechanisms of neuropathic pain - involvement of lysophosphatidic acid receptor-mediated demyelination. *Mol Pain* 4:11.
- Ulmann L, Hatcher JP, Hughes JP, Chaumont S, Green PJ, Conquet F, Buell GN, Reeve AJ, Chessell IP, Rassendren F (2008) Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *J Neurosci* 28:11263-11268.
- Ungureanu D, Saharinen P, Junttila I, Hilton DJ, Silvennoinen O (2002) Regulation of Jak2 through the ubiquitin-proteasome pathway involves phosphorylation of Jak2 on Y1007 and interaction with SOCS-1. *Mol Cell Biol* 22:3316-3326.
- Urban L, Thompson SW, Dray A (1994) Modulation of spinal excitability: co-operation between neurokinin and excitatory amino acid neurotransmitters. *Trends Neurosci* 17:432-438.
- van Rossum D, Hanisch UK (2004) Microglia. *Metab Brain Dis* 19:393-411.
- Van Wagoner NJ, Benveniste EN (1999) Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. *J Neuroimmunol* 100:124-139.
- Van Wagoner NJ, Oh JW, Repovic P, Benveniste EN (1999) Interleukin-6 (IL-6) production by astrocytes: autocrine regulation by IL-6 and the soluble IL-6 receptor. *J Neurosci* 19:5236-5244.
- Vikman KS, Duggan AW, Siddall PJ (2007) Interferon-gamma induced disruption of GABAergic inhibition in the spinal dorsal horn in vivo. *Pain* 133:18-28.
- Vissers K, De Jongh R, Hoffmann V, Heylen R, Crul B, Meert T (2003) Internal and external factors affecting the development of neuropathic pain in rodents. Is it all about pain? *Pain Pract* 3:326-342.
- Vissers KC, De Jongh RF, Hoffmann VL, Meert TF (2005) Exogenous interleukin-6 increases cold allodynia in rats with a mononeuropathy. *Cytokine* 30:154-159.
- Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6:626-640.
- Vrinten DH, Hamers FF (2003) 'CatWalk' automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing. *Pain* 102:203-209.
- Wagner R, Myers RR (1996) Schwann cells produce tumor necrosis factor alpha: expression in injured and non-injured nerves. *Neuroscience* 73:625-629.

- Wall PD, Gutnick M (1974) Properties of afferent nerve impulses originating from a neuroma. *Nature* 248:740-743.
- Wall PD, Devor M, Inbal R, Scadding JW, Schonfeld D, Seltzer Z, Tomkiewicz MM (1979) Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain* 7:103-111.
- Wang DD, Bordey A (2008) The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol* 86:342-367.
- Wang H, Ehnert C, Brenner GJ, Woolf CJ (2006) Bradykinin and peripheral sensitization. *Biol Chem* 387:11-14.
- Wang H, Kohno T, Amaya F, Brenner GJ, Ito N, Allchorne A, Ji RR, Woolf CJ (2005) Bradykinin produces pain hypersensitivity by potentiating spinal cord glutamatergic synaptic transmission. *J Neurosci* 25:7986-7992.
- Wang S, Lim G, Zeng Q, Sung B, Ai Y, Guo G, Yang L, Mao J (2004) Expression of central glucocorticoid receptors after peripheral nerve injury contributes to neuropathic pain behaviors in rats. *J Neurosci* 24:8595-8605.
- Wang S, Lim G, Zeng Q, Sung B, Yang L, Mao J (2005) Central glucocorticoid receptors modulate the expression and function of spinal NMDA receptors after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 25:488-495.
- Wang XQ, Peng YP, Lu JH, Cao BB, Qiu YH (2009) Neuroprotection of interleukin-6 against NMDA attack and its signal transduction by JAK and MAPK. *Neurosci Lett* 450:122-126.
- Watkins LR, Maier SF (1999) Implications of immune-to-brain communication for sickness and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7710-7713.
- Wei F, Guo W, Zou S, Ren K, Dubner R (2008) Supraspinal glial-neuronal interactions contribute to descending pain facilitation. *J Neurosci* 28:10482-10495.
- Wen Z, Zhong Z, Darnell JE, Jr. (1995) Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82:241-250.
- Werner A, Kloss CU, Walter J, Kreutzberg GW, Raivich G (1998) Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the mouse facial motor nucleus after axonal injury and during regeneration. *J Neurocytol* 27:219-232.
- Wilhelmsson U, Li L, Pekna M, Berthold CH, Blom S, Eliasson C, Renner O, Bushong E, Ellisman M, Morgan TE, Pekny M (2004) Absence of glial fibrillary acidic protein and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration. *J Neurosci* 24:5016-5021.
- Williams LM, Sarma U, Willets K, Smallie T, Brennan F, Foxwell BM (2007) Expression of constitutively active STAT3 can replicate the cytokine-suppressive activity of interleukin-10 in human primary macrophages. *J Biol Chem* 282:6965-6975.
- Winkelstein BA, DeLeo JA (2002) Nerve root injury severity differentially modulates spinal glial activation in a rat lumbar radiculopathy model: considerations for persistent pain. *Brain Res* 956:294-301.
- Winkelstein BA, Rutkowski MD, Sweitzer SM, Pahl JL, DeLeo JA (2001) Nerve injury proximal or distal to the DRG induces similar spinal glial activation and selective cytokine expression but differential behavioral responses to pharmacologic treatment. *J Comp Neurol* 439:127-139.

- Wirenfeldt M, Babcock AA, Ladeby R, Lambertsen KL, Dagnaes-Hansen F, Leslie RG, Owens T, Finsen B (2005) Reactive microgliosis engages distinct responses by microglial subpopulations after minor central nervous system injury. *J Neurosci Res* 82:507-514.
- Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE (1992) Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 355:75-78.
- Woolf CJ, Shortland P, Reynolds M, Ridings J, Doubell T, Coggeshall RE (1995) Reorganization of central terminals of myelinated primary afferents in the rat dorsal horn following peripheral axotomy. *J Comp Neurol* 360:121-134.
- Woolf CJ (2004) Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann Intern Med* 140:441-451.
- Wormald S, Hilton DJ (2004) Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Biol Chem* 279:821-824.
- Wormald S, Zhang JG, Krebs DL, Mielke LA, Silver J, Alexander WS, Speed TP, Nicola NA, Hilton DJ (2006) The comparative roles of suppressor of cytokine signaling-1 and -3 in the inhibition and desensitization of cytokine signaling. *J Biol Chem* 281:11135-11143.
- Xia XG, Hofmann HD, Deller T, Kirsch M (2002) Induction of STAT3 signaling in activated astrocytes and sprouting septal neurons following entorhinal cortex lesion in adult rats. *Mol Cell Neurosci* 21:379-392.
- Xie W, Strong JA, Li H, Zhang JM (2007) Sympathetic sprouting near sensory neurons after nerve injury occurs preferentially on spontaneously active cells and is reduced by early nerve block. *J Neurophysiol* 97:492-502.
- Xing H, Chen M, Ling J, Tan W, Gu JG (2007) TRPM8 mechanism of cold allodynia after chronic nerve injury. *J Neurosci* 27:13680-13690.
- Yamauchi K, Osuka K, Takayasu M, Usuda N, Nakazawa A, Nakahara N, Yoshida M, Aoshima C, Hara M, Yoshida J (2006) Activation of JAK/STAT signalling in neurons following spinal cord injury in mice. *J Neurochem* 96:1060-1070.
- Yan HQ, Banos MA, Herregodts P, Hooghe R, Hooghe-Peters EL (1992) Expression of interleukin (IL)-1 beta, IL-6 and their respective receptors in the normal rat brain and after injury. *Eur J Immunol* 22:2963-2971.
- Yang H, Joo KI, Ziegler L, Wang P (2009) Cell Type-Specific Targeting with Surface-Engineered Lentiviral Vectors Co-displaying OKT3 Antibody and Fusogenic Molecule. *Pharm Res*.
- Yang L, Bailey L, Baltimore D, Wang P (2006) Targeting lentiviral vectors to specific cell types in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:11479-11484.
- Yang XP, Irani K, Mattagajasingh S, Dipaula A, Khanday F, Ozaki M, Fox-Talbot K, Baldwin WM, 3rd, Becker LC (2005) Signal transducer and activator of transcription 3alpha and specificity protein 1 interact to upregulate intercellular adhesion molecule-1 in ischemic-reperfused myocardium and vascular endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1395-1400.
- Yasukawa H, Ohishi M, Mori H, Murakami M, Chinen T, Aki D, Hanada T, Takeda K, Akira S, Hoshijima M, Hirano T, Chien KR, Yoshimura A (2003) IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat Immunol* 4:551-556.
- Yoon HJ, Jeon SB, Suk K, Choi DK, Hong YJ, Park EJ (2008) Contribution of TLR2 to the initiation of ganglioside-triggered inflammatory signaling. *Mol Cells* 25:99-104.

- Yu X, Kennedy RH, Liu SJ (2003) JAK2/STAT3, not ERK1/2, mediates interleukin-6-induced activation of inducible nitric-oxide synthase and decrease in contractility of adult ventricular myocytes. *J Biol Chem* 278:16304-16309.
- Zanjani TM, Sabetkasaei M, Mosaffa N, Manaheji H, Labibi F, Farokhi B (2006) Suppression of interleukin-6 by minocycline in a rat model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 538:66-72.
- Zeilhofer HU (2007) Prostanoids in nociception and pain. *Biochem Pharmacol* 73:165-174.
- Zeilhofer HU (2008) Loss of glycinergic and GABAergic inhibition in chronic pain--contributions of inflammation and microglia. *Int Immunopharmacol* 8:182-187.
- Zelenka M, Schafers M, Sommer C (2005) Intraneural injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain. *Pain* 116:257-263.
- Ziegler L, Yang L, Joo K, Yang H, Baltimore D, Wang P (2008) Targeting lentiviral vectors to antigen-specific immunoglobulins. *Hum Gene Ther* 19:861-872.
- Zhang JG, Farley A, Nicholson SE, Willson TA, Zugaro LM, Simpson RJ, Moritz RL, Cary D, Richardson R, Hausmann G, Kile BJ, Kent SB, Alexander WS, Metcalf D, Hilton DJ, Nicola NA, Baca M (1999) The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2071-2076.
- Zhang JM, Li H, Liu B, Brull SJ (2002) Acute topical application of tumor necrosis factor alpha evokes protein kinase A-dependent responses in rat sensory neurons. *J Neurophysiol* 88:1387-1392.
- Zhang XL, Peng XQ, Jing YL, Xie WR, Xie YK (2003) Sialic acid contributes to generation of ectopic spontaneous discharges in rats with neuropathic pain. *Neurosci Lett* 346:65-68.
- Zhong J, Dietzel ID, Wahle P, Kopf M, Heumann R (1999) Sensory impairments and delayed regeneration of sensory axons in interleukin-6-deficient mice. *J Neurosci* 19:4305-4313.
- Zhuang ZY, Gerner P, Woolf CJ, Ji RR (2005) ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. *Pain* 114:149-159.
- Zhuang ZY, Wen YR, Zhang DR, Borsello T, Bonny C, Strichartz GR, Decosterd I, Ji RR (2006) A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. *J Neurosci* 26:3551-3560.
- Zhuang ZY, Kawasaki Y, Tan PH, Wen YR, Huang J, Ji RR (2007) Role of the CX3CR1/p38 MAPK pathway in spinal microglia for the development of neuropathic pain following nerve injury-induced cleavage of fractalkine. *Brain Behav Immun* 21:642-651.
- Zou T, Ouyang L, Chen L, Dong W, Qiao H, Liu Y, Qi Y (2008) The role of microtubule-associated protein 1S in SOCS3 regulation of IL-6 signaling. *FEBS Lett*.
- Zuo Y, Perkins NM, Tracey DJ, Geczy CL (2003) Inflammation and hyperalgesia induced by nerve injury in the rat: a key role of mast cells. *Pain* 105:467-479.