

Expression de la protéine c-Fos dans la corne dorsale de la moelle épinière

Une technique pour étudier certains aspects physiopharmacologiques de la nociception

Jaroslava Buritova, Jean-Marie Besson

De nombreux travaux utilisent la mise en évidence de la protéine c-Fos par immunohistochimie dans les noyaux des neurones comme marqueur d'activité neuronale. La protéine c-Fos est codée par le gène c-fos, un gène à expression précoce immédiate, qui est rapidement activé à la suite de différents types de stimulations, y compris des stimulations nociceptives. Même si l'expression de la protéine c-Fos, notamment au niveau de la moelle

épinière, est largement utilisée pour certaines études physiopharmacologiques, l'utilisation de cette technique dans le domaine de la douleur reste discutée. Considérant les avantages et certaines limites de cette approche, nous présentons les arguments en faveur de l'utilisation de la technique c-Fos pour aborder certains aspects physiopharmacologiques de processus nociceptifs, notamment ceux d'origine inflammatoire.

Les études relatives aux aspects physiopathologiques et pharmacologiques des processus nociceptifs sont en général fondées sur des tests comportementaux et des techniques électrophysiologiques et biochimiques. Au cours des dix dernières années, une nouvelle approche méthodologique a été utilisée, notamment au niveau de la moelle épinière, pour visualiser les neurones impliqués dans les processus nociceptifs. Cette technique repose sur la mise en évidence immunohistochimique de la protéine c-Fos dans les noyaux des neurones en réponse aux différentes stimulations périphériques nociceptives ([1], pour références, voir [2]). La protéine c-Fos est codée par un gène à expression précoce immédiate, le proto-oncogène *c-fos* (figure 1) (pour revue, voir [3, 4]). Dans certains neurones de la moelle épinière, ce gène peut être rapidement activé par des

stimulations nociceptives [1]. Certaines études [5-7] ont évalué simultanément l'expression spinale de plusieurs protéines (Fos B, c-Jun, Jun B, Jun D et Krox-24) codées par des gènes à expression précoce immédiate à la suite d'une stimulation nociceptive. Par rapport à ces autres protéines, la protéine c-Fos présente l'avantage d'une expression négligeable en l'absence de stimulation, ce qui permet une quantification plus aisée de l'activité évoquée.

c-Fos et activité neuronale

En dépit de la large utilisation de la technique immunohistochimique fondée sur la mise en évidence de la protéine c-Fos (dite technique c-Fos), le(s) rôle(s) exact(s) de la protéine c-Fos et son implication dans les processus nociceptifs ne sont pas entièrement connus et restent vivement discutés (pour références, voir

[2, 8, 9]). Une question majeure est de savoir si l'expression de la protéine c-Fos est liée à l'activité neuronale. La réponse est positive si l'activité neuronale est considérée dans son ensemble, comprenant l'activité synaptique et extrasynaptique, et la communication intracellulaire *via* les seconds messagers [9, 10] (figures 1 et 2). A titre d'exemple, après des stimulations périphériques nociceptives inflammatoires, le marquage de c-Fos observé dans les neurones au niveau médullaire, qui est considérablement réduit par des anesthésiques locaux [11], n'est pas observé dans les neurones des ganglions rachidiens dorsaux [1, 12]. Ces données suggèrent que, dans les neurones ganglionnaires, la conduction du potentiel d'action n'est pas suffisante pour induire l'expression de la protéine c-Fos. En revanche, au niveau des couches superficielles de la moelle épinière où se projettent essentielle-

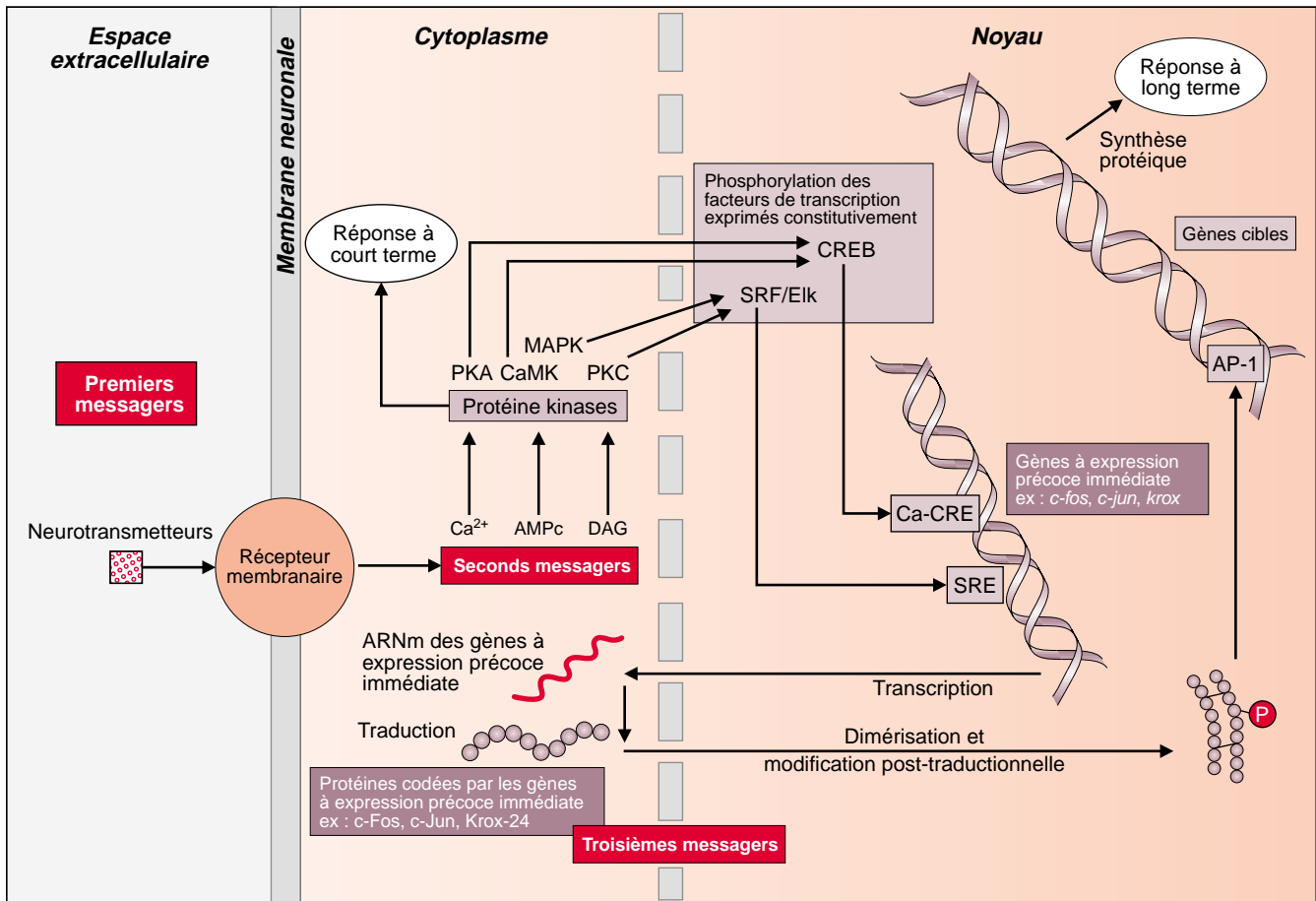


Figure 1. **Mécanismes de l'expression des gènes à expression précoce immédiate.** Les neurotransmetteurs agissent comme premiers messagers sur des récepteurs spécifiques et induisent une modification de l'activité des messagers secondaires. Les seconds messagers (par exemple : nucléotides cycliques, inositol phosphates, ions calcium) exercent leurs effets par l'intermédiaire de protéine-kinases. L'altération de la phosphorylation des protéines par les kinases entraîne des changements des propriétés biochimiques ou biophysiques des protéines cibles (la réponse à court terme). Certaines de ces protéines cibles (CREB, SRF) sont impliquées dans la régulation de la transcription et leur phosphorylation provoque l'activation de gènes spécifiques. Une classe de ces gènes activés par les seconds messagers est constituée par les gènes à expression précoce immédiate (par exemple : c-fos, c-jun, krox-24). Les protéines codées par ces gènes peuvent être considérées comme des « troisièmes messagers » qui, à partir des signaux extracellulaires sur la membrane, induisent des réponses à long terme en modifiant au niveau nucléaire l'expression de gènes cibles par fixation sur les sites régulateurs de leur promoteur, c'est-à-dire en changeant les paramètres de transcription des gènes à expression tardive. (Modifié d'après [3].)

ment les fibres afférentes primaires nociceptives et où différents neurotransmetteurs sont présents et libérés (voir plus loin), l'expression de c-Fos est fortement activée.

Bien que la technique c-Fos soit utilisée comme technique de « marquage » de l'activité cellulaire, nous ne connaissons que très peu les différents mécanismes impliqués dans l'expression de la protéine c-Fos. Néanmoins, des études *in vitro* ont suggéré que le système NMDA/calcium/calmoduline

serait en grande partie responsable de cette activation (pour références, voir [10]). Au niveau médullaire, les neurotransmetteurs intervenant dans les processus nociceptifs, par exemple les acides aminés excitateurs et la substance P, peuvent induire la dépolarisation et/ou l'activation synaptique des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière avec un accroissement de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire qui peut aboutir à l'expression de la protéine c-

Fos (figures 1 et 2). La protéine c-Fos forme des hétérodimères avec les protéines de la famille Jun. Ces hétérodimères Fos-Jun se lient aux sites régulateurs de la séquence AP-1 de l'ADN pour contrôler et régler l'expression des gènes cibles (figure 1). Ainsi, la protéine c-Fos n'est pas seulement un marqueur indirect de l'activité neuronale, mais également un reflet des modifications à long terme que peut provoquer une stimulation (pour revue, voir [2, 8]).

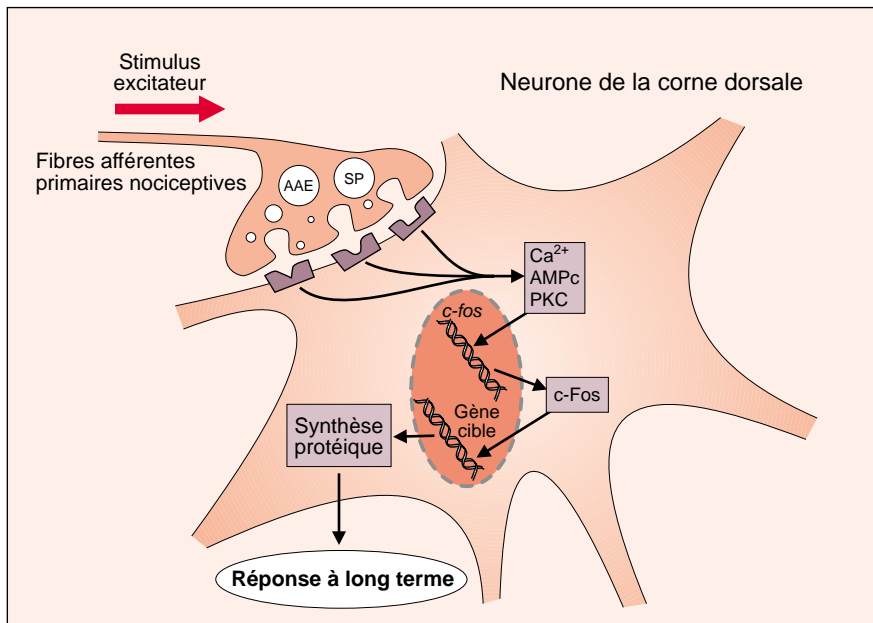


Figure 2. Mécanismes de l'expression de la protéine c-Fos dans les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière au cours de la transmission des messages nociceptifs. Le message nociceptif arrivant par les fibres afférentes primaires représente un stimulus excitateur pour les neurones de la corne dorsale. La libération des neurotransmetteurs liés à la transmission des messages nociceptifs (des acides aminés excitateurs [AAE], tels que le glutamate et l'aspartate, et les neuropeptides tels que la substance P [SP] peut, par l'intermédiaire des seconds messagers, induire l'activation des gènes à expression précoce immédiate tels que c-fos. (Modifié d'après [8].)

Avantages de la technique

La technique c-Fos présente l'avantage d'une résolution cellulaire avec un niveau d'activité basale extrêmement faible [1]. L'ensemble de nos travaux confirment ces données puisqu'en l'absence de stimulation, le nombre de neurones c-Fos immunoréactifs (c-Fos-IR) est inférieur à 5 par coupe (40 µm d'épaisseur) au niveau des segments L4-L5 de la moelle épinière (figure 4A). En revanche, après une stimulation inflammatoire nociceptive due à l'injection intraplantaire de carragénine, le nombre de neurones spinaux c-Fos-IR observés du côté ipsilatéral est généralement supérieur à 100, alors qu'aucune augmentation de marquage c-Fos n'est observée du côté controlatéral (figure 4B1). Ces conditions sont donc idéales pour détecter les modifications du nombre de neurones c-Fos-IR en réponse à des stimulations nociceptives, et les effets de différents

prétraitements pharmacologiques. Tel n'est pas le cas d'autres protéines codées par des gènes à expression précoce immédiate (par exemple : Krox-24 qui présente une expression basale bilatérale [13]). De plus, les autres techniques de marquage de l'activité cellulaire présentent certaines limites par rapport à la technique c-Fos. La technique au 2-désoxyglucose [14-16] ne permet pas une résolution cellulaire. La révélation de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase manque de discrimination, puisque son niveau basal est déjà élevé en l'absence de stimulation [17].

La technique c-Fos permet d'associer certains aspects proches de l'électrophysiologie (l'étude de la réponse à une stimulation donnée codifiée) à des aspects de l'anatomie (cartographie des neurones répondant à cette stimulation). De plus, la technique c-Fos peut être couplée à d'autres techniques de marquage (double marquage immunohistochimique

avec détection de récepteurs GABA ou glycine [18], traceur rétrograde [19, 20], immunohistochimie et hybridation *in situ* – préproenkephaline ou prodynorphine [21, 22]), ce qui permet d'étudier certaines caractéristiques anatomo-fonctionnelles des neurones exprimant la protéine c-Fos.

Bien qu'en règle générale la technique c-Fos se soit révélée décevante pour l'étude des structures supraspinales impliquées dans les processus nociceptifs (voir cependant [23]), elle s'est révélée particulièrement efficace au niveau médullaire, où elle permet d'analyser, chez un même l'animal, les deux principales populations neuronales de la corne dorsale de la moelle épinière impliquées dans les processus nociceptifs (couches superficielles I-II et couches profondes V-VI) (pour références, voir [24, 25]) (figures 3 et 4). Tel n'est pas le cas des techniques électrophysiologiques qui ne peuvent être réalisées que sur un nombre très limité de neurones par animal. De plus, les études électrophysiologiques, au niveau médullaire, nécessitent une préparation chirurgicale lourde associée à une anesthésie générale. Néanmoins, les techniques électrophysiologiques restent irremplaçables car elles permettent de suivre en direct l'activité cellulaire et ses modifications à la suite de diverses conditions expérimentales. Dans le cas de la technique c-Fos, la protéine c-Fos n'est pas détectable de façon instantanée du fait d'un décalage entre sa synthèse et la stimulation appliquée. Ce décalage comprend, d'une part, le délai d'expression de l'ARN messager c-Fos (qui est maximal environ 30 minutes après une stimulation inflammatoire nociceptive due à l'injection intraplantaire de carragénine [12]) et, d'autre part, l'expression de la protéine c-Fos (qui atteint son maximum 3 heures après l'injection de carragénine [26]).

Un avantage majeur de la technique c-Fos par rapport aux techniques électrophysiologiques réside dans le fait que la technique c-Fos peut être réalisée chez l'animal éveillé libre de ses mouvements et permet ainsi de corrélérer les observations comportementales et/ou cliniques (dans notre

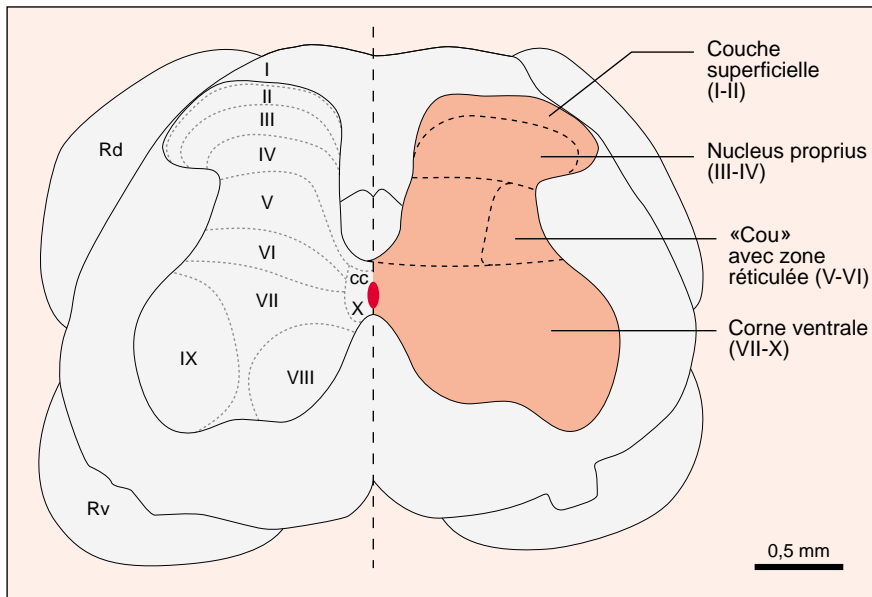


Figure 3. **Différentes couches de la substance grise de la moelle épinière au niveau des segments lombaires L4-L5.** Prenant en compte la division laminaire de la substance grise médullaire en dix couches (I à X) selon des critères cytoarchitecturaux (partie gauche de la figure), nous avons arbitrairement défini quatre régions de la substance grise (partie droite de la figure) pour le comptage de neurones c-Fos-IR : les couches superficielles (couches I et II), le nucleus proprius (couches III et IV), le cou de la corne dorsale (couches V et VI) et la corne ventrale (couches VII-X). Cc : canal central ; Rd : racine dorsale ; Rv : racine ventrale.

cas, les paramètres de l'œdème périphérique) aux modifications observées dans le système nerveux central, reflétées par le nombre de neurones c-Fos-IR [23, 27]. De notre point de vue, un autre intérêt de la technique c-Fos pour les études pharmacologiques réside dans le fait qu'elle permet d'évaluer les effets des substances analgésiques classiques ou potentielles dans des conditions d'administration proches de celles rencontrées en clinique. Elle permet l'administration par voie orale, ce qui n'est pas aisé, voire impossible, sous anesthésie générale associée aux enregistrements d'activité unitaire neuronale à l'aide de micro-électrode.

Limites et controverses

Néanmoins, une des limites de la technique c-Fos, lors d'études pharmacologiques relatives à la nociception, réside dans la nécessité d'administrer la substance étudiée avant le début de la stimulation périphérique.

Par exemple, la morphine à doses analgésiques diminue le nombre de neurones spinaux c-Fos-IR lorsqu'elle est administrée avant la stimulation nociceptive thermique, mais elle n'a pas d'effet lorsqu'elle est administrée après cette stimulation [28]. De même, chez le rat polyarthritique, des doses élevées de morphine qui, du point de vue comportemental, induisent un effet antinociceptif marqué, ne modifient pas l'expression de la protéine c-Fos lorsque celle-ci est déjà exprimée dans un grand nombre de neurones spinaux [29]. Ces résultats indiquent indiscutablement que la protéine c-Fos est difficile à manipuler lorsqu'elle est déjà synthétisée ou en cours de synthèse. Dans ces conditions, il est difficile de démasquer l'action de la substance étudiée. Pour cette raison, il est nécessaire de prendre en considération la pharmacocinétique de la substance étudiée afin de choisir les conditions optimales de son administration.

Enfin, pour la technique c-Fos, on doit tenir compte du fait qu'il peut

exister des variations dans la sensibilité de la réaction immunohistochemique d'une série expérimentale à l'autre. Ces variations n'étant pas facilement contrôlables, il est donc nécessaire que chaque série expérimentale comporte des animaux témoins, et que la réaction immunohistochemique soit réalisée en même temps pour toutes les coupes de tissus provenant d'animaux appartenant à une même série expérimentale. Un autre problème concerne la quantification de l'intensité du marquage c-Fos. En règle générale, nous avons remarqué que l'intensité du marquage c-Fos au niveau médullaire augmentait avec l'intensité de la stimulation nociceptive. Cependant, comme il est pratiquement impossible de prendre en compte l'intensité du marquage pour chacun des neurones c-Fos-IR (pour exemple, voir figure 4B3), nous avons dû prendre en compte le nombre des neurones c-Fos-IR, sans distinguer l'intensité du marquage.

Bien que de très nombreux travaux utilisent la technique c-Fos pour l'étude de processus nociceptifs, essentiellement au niveau médullaire, cette application est toujours controversée. L'un des problèmes majeurs d'utilisation de cette technique concerne la spécificité du marquage c-Fos. Ce problème apparaît déjà dans l'étude initiale de Hunt *et al.* [1] qui montrait que l'expression spinale de c-Fos pouvait être induite au niveau des couches superficielles (I-II) par des stimulations nociceptives cutanées (thermiques ou chimiques), mais également à un moindre degré par des stimulations non nociceptives (mécaniques ou proprioceptives) au niveau des couches plus profondes (III-IV) (voir également [30]). En revanche, d'autres études n'ont pas retrouvé l'expression spinale de c-Fos lors de stimulations non nociceptives (pour références, voir [31]). De plus, de très nombreuses études insistent sur le fait que la répartition laminaire des neurones c-Fos-IR, au niveau des couches superficielles (I-II) et profondes (V-VI) de la corne dorsale de la moelle épinière, constitue un argument indirect en faveur de l'expression préférentielle de la protéine c-Fos par les neurones recevant des

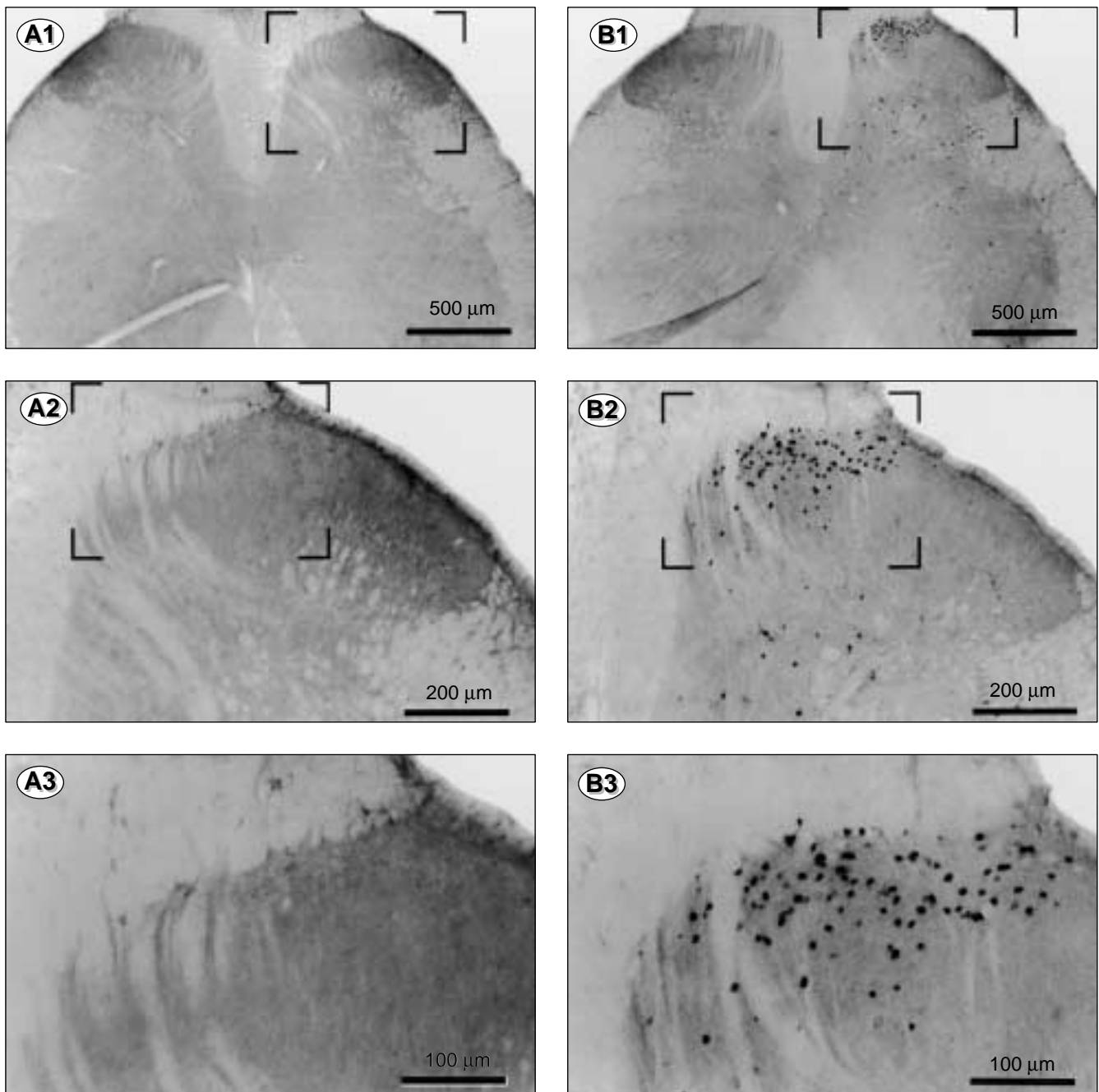


Figure 4. *Microphotographies de l'expression de la protéine c-Fos dans une coupe frontale de 40 μm au niveau de segments L4-L5 de la moelle épinière chez le rat éveillé, après une injection intraplantaire de sérum physiologique ou de carragénine. A₁, A₂, A₃. Absence d'expression de la protéine c-Fos au niveau de la moelle épinière, trois heures après une stimulation non nociceptive due à l'injection intraplantaire de sérum physiologique. B₁, B₂, B₃. Expression de la protéine c-Fos dans les noyaux des neurones au niveau de la moelle épinière, trois heures après une stimulation inflammatoire nociceptive induite par l'injection intraplantaire de carragénine (6 mg dans 150 μl de sérum physiologique). Les noyaux des neurones c-Fos-IR sont exclusivement situés du côté ipsilatéral à l'œdème périphérique induit par la carragénine, avec une localisation préférentielle dans les couches superficielles I-II et profondes V-VI.*

messages nociceptifs (pour revue, voir [32]). En tenant compte des données électrophysiologiques, il s'agit des régions dans lesquelles est localisée la majorité de neurones recevant, exclusivement ou non, des messages nociceptifs (pour références, voir [24, 25]). A titre d'exemple, notons qu'après une stimulation nociceptive inflammatoire due à la carragénine, environ 80 % du nombre total des neurones c-Fos-IR sont localisés dans les couches I-II et V-VI, alors que seulement 6 % du nombre total des neurones c-Fos-IR se situent au niveau des couches III-IV où se terminent les fibres mises en jeu par des stimulations tactiles légères (voir figure 4B).

c-Fos et nociception

En dépit du fait que l'expression de la protéine c-Fos n'ait jamais été définie comme un marqueur spécifique d'activité neuronale liée à la nociception [31, 33], les nombreux résultats accumulés à partir de l'étude initiale de Hunt *et al.* [1] plaident en faveur d'un marquage préférentiel. Rappelons les principales données qui vont à l'appui de cette hypothèse :

1. Toutes les modalités de stimulations nociceptives périphériques étudiées (cutanées : chimiques, mécaniques, thermiques chaudes et froides ; viscérales : chimiques et mécaniques) sont capables d'induire l'expression de la protéine c-Fos au niveau médullaire (pour références, voir [2, 32]).

2. En utilisant la stimulation électrique du nerf sciatique, Herdegen *et al.* [5] ont montré que l'activation des fibres afférentes nociceptives A δ et C, mais non celle de grosses fibres myélinisées A α / β , induisait l'expression spinale de c-Fos. Ces données concordent avec le fait que le nombre de neurones spinaux, dont c-Fos-IR, induits par une stimulation nociceptive inflammatoire, est considérablement réduit chez des rats ayant subi dès la naissance un traitement à la capsaïcine qui détruit sélectivement une grande proportion de fibres C [34]. De même, le blocage préférentiel de fibres afférentes fines nociceptives, par une injection intraplantaire d'anesthésiques locaux, diminue considérablement le

nombre de neurones c-Fos-IR induit par l'injection intraplantaire de carragénine [11]. Enfin, chez les rats nouveau-nés, l'expression spinale de la protéine c-Fos correspond à la maturation postnatale des fibres afférentes fines nociceptives [35]. L'ensemble de ces données indique que l'activation des fibres nociceptives joue un rôle essentiel pour l'expression spinale de la protéine c-Fos.

3. Le nombre de neurones spinaux c-Fos-IR s'accroît progressivement en fonction de l'intensité et de la durée de la stimulation nociceptive thermique chaude [36]. Pour les stimulations d'origine inflammatoire dues à la carragénine, le nombre de neurones spinaux c-Fos-IR, qui s'accroît avec la dose de carragénine, est étroitement corrélé avec l'œdème périphérique [23] (voir figure 5).

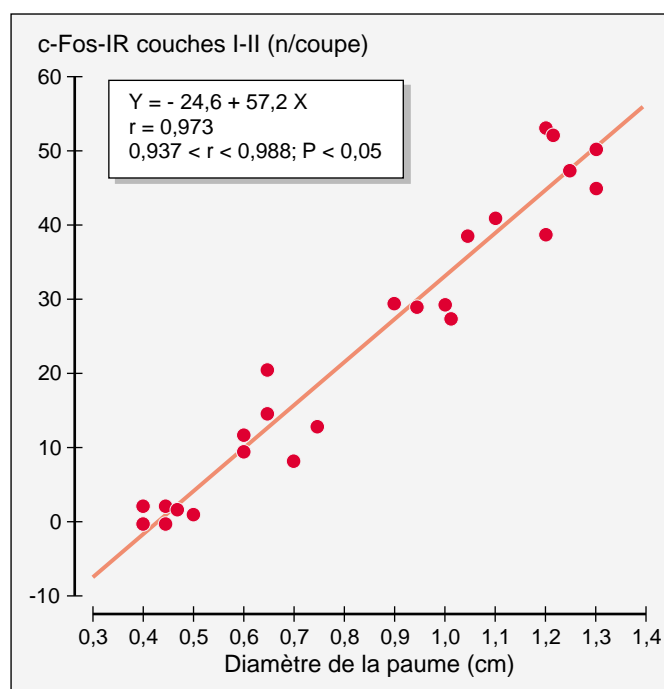
4. Il existe une bonne correspondance entre le nombre de neurones spinaux c-Fos-IR et le développement de signes cliniques et comportementaux observés au cours de la polyar-

thrite induite par l'administration de l'adjuvant de Freund, un modèle expérimental de douleur chronique inflammatoire [27]. De plus, la technique c-Fos permet de détecter les phénomènes d'hyperalgésie classiquement observés chez ces rats [29].

5. Les neurones spinaux c-Fos-IR, induits par une stimulation nociceptive, sont soit des interneurons soit des neurones se projetant directement vers le thalamus ou la région parabrachiale qui sont impliqués dans les processus nociceptifs [19, 20].

6. Le nombre de neurones spinaux c-Fos-IR, induits par une stimulation nociceptive (mécanique ou thermique), est réduit lors de l'activation des systèmes inhibiteurs descendants bulbo-spinaux [37, 38], systèmes qui sont fortement impliqués dans la modulation inhibitrice de la transmission des messages nociceptifs au niveau spinal.

7. Enfin, l'expression spinale de la protéine c-Fos, induite par stimulation nociceptive, peut être modulée



de différentes doses de carragénine (0,2, 1 ou 6 mg dans 150 μ l de sérum physiologique; n = 6 pour chaque groupe) ou de sérum physiologique chez les rats témoins (n = 6). (Modifié d'après [23].)

de différentes doses de carragénine (0,2, 1 ou 6 mg dans 150 μ l de sérum physiologique; n = 6 pour chaque groupe) ou de sérum physiologique chez les rats témoins (n = 6). (Modifié d'après [23].)

par différentes substances impliquées ou non dans les processus nociceptifs (antagoniste du récepteur NMDA et NK1 de la substance P, agoniste du récepteur $\alpha 2$ adrénergique, inhibiteurs de l'enzyme de synthèse de l'oxyde nitrique) (pour références, voir [2, 32]). De plus, de nombreuses études ont montré que le nombre de neurones spinaux, c-Fos-IR induits par des stimulations nociceptives variées, était réduit de façon dépendante de la dose par la morphine, substance antinociceptive de référence. Ces effets sont bloqués par la co-administration d'un antagoniste, la naloxone (pour références, voir [32]). A titre d'exemple, précisons que nous avons utilisé la technique c-Fos de façon quantitative et systématique pour étudier les effets de molécules appartenant aux différentes familles des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), y compris les inhibiteurs non sélectifs de la cyclo-oxygénase COX-1 et COX-2, et un inhibiteur sélectif de la cyclo-oxygénase COX-2 (pour références, voir [39]). Comme le montre la figure 6, ces différents AINS réduisent de façon dépendante de la dose le nombre de neurones spinaux c-Fos-IR induits par une stimulation inflammatoire nociceptive due à la carragénine. De plus, il existe une bonne corrélation entre la diminution du nombre de neurones c-Fos-IR et celle de l'œdème périphérique (voir figure 7 pour le lornoxicam), ce qui suggère que les effets observés au niveau spinal reflètent au moins en partie l'effet périphérique des AINS. Certains AINS sont déjà efficaces à des doses extrêmement faibles (par exemple: 0,1 mg/kg iv pour le lornoxicam; figure 6). Néanmoins, si l'on accroît les doses de ces substances, leurs effets sont très proches puisque la réduction du nombre de neurones spinaux c-Fos-IR se situe entre 50 % et 70 %. Bien que cette étude soit discutable puisque nous avons utilisé différentes voies d'administration des AINS, elle n'est pas sans rappeler de multiples observations cliniques démontrant que les effets des AINS dépendent plus de facteurs individuels que de leur action propre [40].

Conclusions

L'ensemble des données que nous venons de considérer constitue un faisceau d'arguments en faveur de l'utilisation de la technique c-Fos pour aborder l'étude des processus nociceptifs au niveau spinal. En prenant en considération les avantages et certaines limitations de cette approche, elle nous semble plus particulièrement performante pour des études physiopharmacologiques de la nociception liée à l'inflammation. Les études fondées sur l'expression de la protéine c-Fos au niveau spinal font partie intégrante des approches multidisciplinaires pour l'étude des aspects physiopharmacologiques de la nociception ■

Remerciements

Nous remercions vivement le Dr Marc Peschanski et le Pr Marie-Jo Besson pour leurs critiques et leurs conseils.

RÉFÉRENCES

- Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c-Fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 1987; 328: 632-4.
- Munglani R, Hunt SP. Molecular biology of pain. *Br J Anaesth* 1995; 75: 186-92.
- Hughes P, Dragunow M. Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated expression within the nervous system. *Pharmacol Rev* 1995; 47: 133-78.
- Piechaczyk M, Blanchard JM. *c-fos* proto-oncogene regulation and function. *Crit Rev Oncol Hematol* 1994; 17: 93-131.
- Herdegen T, Kovary K, Leah J, Bravo R. Specific temporal and spatial distribution of Jun, Fos and Krox-24 proteins in spinal neurons following noxious transsynaptic stimulation. *J Comp Neurol* 1991; 313: 178-91.
- Lantéri-Minet M, de Pommery J, Herdegen T, Weil-Fugazza J, Bravo R, Menétrey D. Differential time-course and spatial expression of Fos, Jun and Krox-24 proteins in spinal cord of rats undergoing subacute or chronic somatic inflammation. *J Comp Neurol* 1993; 33: 223-35.

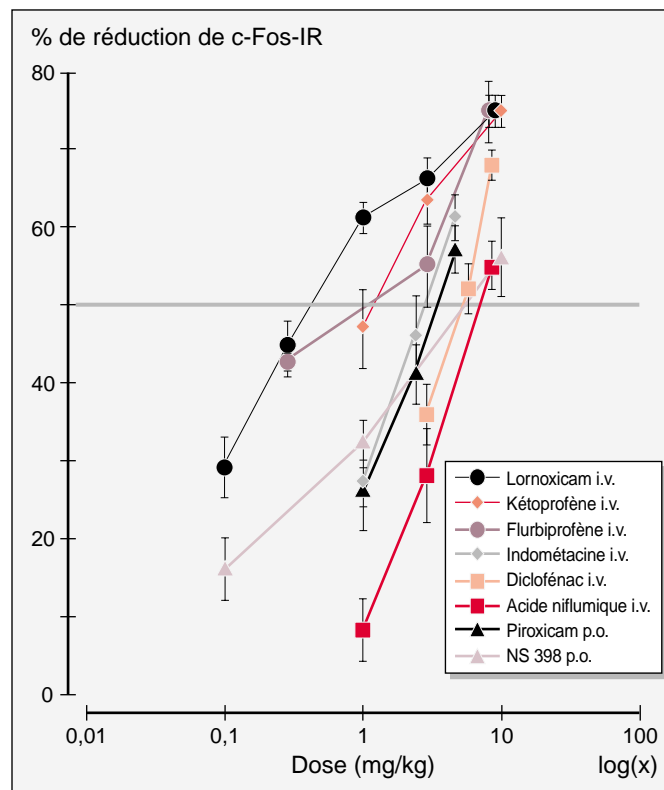
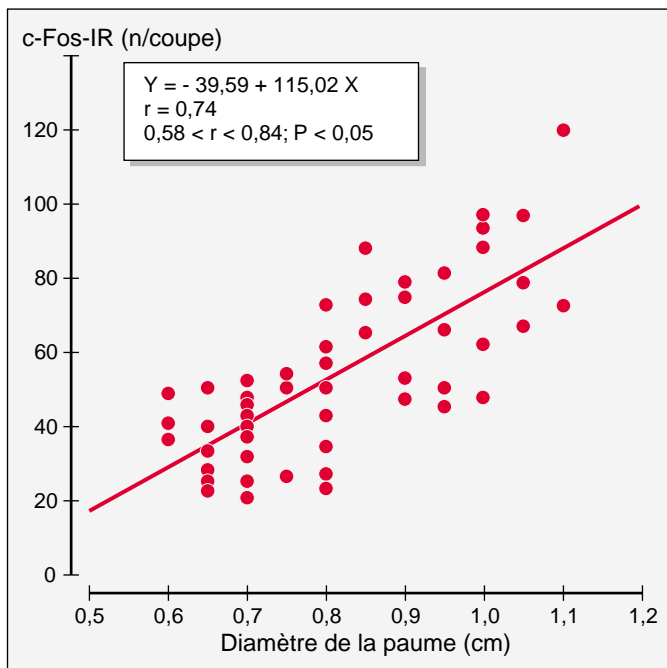


Figure 6. **Effets des différentes molécules anti-inflammatoires non stéroïdiennes sur l'expression spinale de la protéine c-Fos induite par la carragénine.** Inhibiteurs des cyclo-oxygénases-1 et -2 (lornoxicam, kétoprofène, flurbiprofène, indométacine, diclofénac, acide niflumique, piroxicam), et d'un inhibiteur sélectif de la cyclo-oxygénase-2 (NS398). Les résultats sont exprimés en pourcentage de réduction du nombre total de neurones c-Fos-IR (moyenne par

groupe \pm sem) dans les segments L4-L5 de la moelle épinière, trois heures après l'injection intraplantaire de carragénine (6 mg) administrée 25 minutes après l'administration des anti-inflammatoires non stéroïdiens étudiés.



(0,1, 0,3, 1,3 ou 9 mg/kg; n = 10 pour chaque groupe) 25 minutes avant l'injection intraplantaire de carragénine (6 mg). (Modifié d'après [41].)

Figure 7. Corrélation entre les effets du lornoxicam sur l'œdème périphérique (diamètre de la paume) et sur le nombre total de neurones c-Fos-IR par coupe des segments L4-L5 de la moelle épinière, trois heures après la carragénine. Chaque point correspond à la mesure individuelle provenant d'un rat recevant une injection intraveineuse de lornoxicam

RÉFÉRENCES

7. Tölle TR, Herdegen T, Schadrack J, Bravo R, Zimmermann M, Zieglgansberger W. Application of morphine prior to noxious stimulation differentially modulates expression of Fos, Jun and Krox-24 proteins in rat spinal cord neurons. *Neuroscience* 1994; 58: 305-21.

8. Zimmerman M, Herdegen T. Control of gene transcription by Jun and Fos proteins in the nervous system. Beneficial or harmful molecular mechanisms of neuronal response to noxious stimulation. *APS J* 1994; 3: 33-48.

9. Iadarola MJ. Stimulus-transcription coupling and immediate-early genes. *APS J* 1994; 3: 56-9.

10. Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends Neurosci* 1989; 12: 459-62.

11. Buritova J, Fletcher D, Honoré P, Besson JM. Effects of local anaesthetics on carrageenan-evoked inflammatory nociceptive processing in the rat. *Br J Anaesth* 1996; 77: 645-2.

12. Draisci G, Iadarola MJ. Temporal analysis of increases in c-Fos, preprodynorphin and preproenkephalin mRNAs in rat spinal cord. *Mol Brain Res* 1989; 6: 31-7.

13. Buritova J, Honoré P, Besson JM. Indomethacin reduces both Krox-24 expression in the rat lumbar spinal cord and inflammatory signs following intraplantar carrageenan. *Brain Res* 1995; 674: 211-20.

14. Mao J, Price DD, Coghill RC, Mayer DJ, Hayes RL. Spatial patterns of spinal cord [¹⁴C]-2-deoxyglucose metabolic activity in a rat model of painful peripheral mononeuropathy. *Pain* 1992; 50: 89-100.

15. Coghill RC, Price DD, Hayes RL, Mayer DJ. Spatial distribution of nociceptive processing in the rat spinal cord. *J Neurophysiol* 1991; 65: 133-40.

16. Abram SE, Kostreva DR. Spinal cord metabolic response to noxious radiant heat stimulation of the cat hind footpad. *Brain Res* 1986; 385: 143-7.

17. Wong-Riley MTT, Kageyama GH. Localization of cytochrome oxidase in the mammalian spinal cord and dorsal root ganglia with quantitative analysis of ventral horn cells in monkeys. *J Comp Neurol* 1986; 245: 41-61.

18. Todd AJ, Spike RC, Brodbelt AR, Price RF, Shehab SAS. Some inhibitory neurons in the spinal cord develop c-Fos-immunoreactivity after noxious stimulation. *Neuroscience* 1994; 63: 805-16.

19. Menétrey D, Gannon A, Levine JD, Basbaum A. Expression of c-Fos protein in interneurons and projection neurons of the rat spinal cord in response to noxious somatic, articular and visceral stimulation. *J Comp Neurol* 1989; 285: 177-95.

20. Jasmin L, Wang H, Tarcy-Hornoch K, Levine JD, Basbaum A. Differential effects of morphine on noxious stimulus-evoked Fos-like immunoreactivity in subpopulation of spinoparabrachial neurons. *J Neurosci* 1994; 14: 7252-60.

21. Noguchi K, Kowalski K, Traub R, Solodkin A, Iadarola MJ, Ruda MA. Dynorphin expression and Fos-like immunoreactivity following inflammation induced hyperalgesia are colocalized in spinal cord neurons. *Mol Brain Res* 1991; 10: 227-33.

22. Noguchi K, Dubner R, Ruda MA. Preproenkephalin mRNA in spinal dorsal horn neurons is induced by peripheral inflammation and is co-localized with Fos and Fos-related proteins. *Neuroscience* 1992; 46: 561-70.

23. Buritova J, Besson JM, Bernard JF. Involvement of the spinoparabrachial pathway in inflammatory nociceptive processes: a c-Fos protein study in the awake rat. *J Comp Neurol* 1998; 397: 10-28.

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

25. Willis WD, Coggeshall RE. Structure of the dorsal horn. In: *Sensory mechanisms of the spinal cord*, 2nd ed. New York: Plenum Press, 1991: 79-151.

26. Honoré P, Buritova J, Besson JM. Carrageenan-evoked c-Fos expression in rat lumbar spinal cord: the effects of indomethacin. *Eur J Pharmacol* 1995; 272: 249-59.

27. Abbadie C, Besson JM. c-fos expression in rat lumbar spinal cord during the development of adjuvant-induced arthritis. *Neuroscience* 1992; 48: 985-93.

28. Tölle TR, Schadrack J, Castro-Lopes JM, Evan G, Roques BP, Zieglgansberger W. Effects of Kelatorphan and morphine before and after noxious stimulation on immediate-early gene expression in rat spinal cord neurons. *Pain* 1994; 56: 103-12.

29. Abbadie C, Besson JM. Effects of morphine and naloxone on basal and evoked Fos-like immunoreactivity in lumbar spinal cord neurons of arthritic rats. *Pain* 1993; 52: 29-39.

30. Jasmin L, Gogas KR, Ahlgren SC, Levine JD, Basbaum A. Walking evokes a distinctive pattern of Fos-like immunoreactivity in the caudal brainstem and spinal cord of the rat. *Neuroscience* 1994; 58: 275-86.

31. Bullitt E. Expression of c-Fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol* 1990; 296: 517-30.

RÉFÉRENCES

32. Chapman V, Besson JM. Pharmacological studies of nociceptive systems using the c-Fos immunohistochemical technique: an indicator of noxiously activated spinal neurons. In: Dickenson A, Besson JM, eds. *Handbook of experimental pharmacology, vol. 130. The pharmacology of pain*. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 1997: 235-79.
33. Fitzgerald M. c-Fos and the changing face of pain. *Trends Neurosci* 1990; 13: 439-40.
34. Hylden JLK, Noguchi K, Ruda MA. Neonatal capsaicin treatment attenuates spinal Fos activation and dynorphin gene expression following peripheral tissue inflammation and hyperalgesia. *J Neurosci* 1992; 12: 1716-25.
35. Yi DK, Barr GA. The induction of Fos-like immunoreactivity by noxious thermal, mechanical and chemical stimuli in the lumbar spinal cord of infant rats. *Pain* 1995; 60: 257-65.
36. Abbadie C, Honoré P, Fournié-Zaluski MC, Roques BP, Besson JM. Effects of opioids and non-opioids on c-Fos immunoreactivity induced in rat lumbar spinal cord neurons by noxious heat stimulation. *Eur J Pharmacol* 1994; 258: 215-27.
37. Jones SL, Light AR. Electrical stimulation in the medullary nucleus raphe magnus inhibits noxious heat-evoked Fos protein-like immunoreactivity in the rat lumbar spinal cord. *Brain Res* 1990; 530: 335-8.
38. Morgan MM, Gogas KR, Basbaum AI. Diffuse noxious inhibitory controls reduce the expression of noxious stimulus-evoked Fos-like immunoreactivity in the superficial and deep laminae of the rat spinal cord. *Pain* 1994; 56: 347-52.
39. Buritova J, Besson JM. Peripheral and/or central effects of racemic, S(+)- and R(-)-flurbiprofen on inflammatory nociceptive processes: a c-Fos protein study in the rat spinal cord. *Br J Pharmacol* 1998; 125: 87-101.
40. Tramer MR, Williams JE, Carroll D, Wiffen PJ, Moore RA, McQuay HJ. Comparing analgesic efficacy of non-steroidal anti-inflammatory drugs given by different routes in acute and chronic pain: a qualitative systematic review. *Acta Anaesthesiol Scand* 1998; 42: 71-9.
41. Buritova J, Besson JM. Dose-related anti-inflammatory/analgesic effects of lornoxicam: a spinal c-Fos protein study in the rat. *Inflamm Res* 1998; 47: 18-25.

Jaroslava Buritova
Jean-Marie Besson

Inserm U. 161, Unité de recherches de physiopharmacologie du système nerveux, 2, rue d'Alésia, 75014 Paris, France.

TIRÉS A PART

J. Buritova.

Summary

c-Fos protein expression in the dorsal horn of the spinal cord, a technique to study some physiopharmacological aspects of nociception

The expression of nuclear protein c-Fos encoded by the immediate-early gene *c-fos* has been shown as one possible anatomical indicator of neuronal activity. At the spinal cord level, especially in the dorsal horn neurons, the c-Fos protein expression evoked by nociceptive stimulation has been extensively used as an indirect marker of neurons involved in spinal nociceptive transmission. Furthermore, there is clear evidence for the effects of various anti-inflammatory/analgesic substances on spinal c-Fos protein expression evoked by peripheral noxious stimulation, particularly that having inflammatory origin. However, there are still a number of ambiguities concerning the meaning, validity and specificity of c-Fos protein expression as a marker of neuronal activity which should be considered. Considering numerous advantages, but also limitations, of the c-Fos technique, we provide arguments in favour of the use of the c-Fos technique at the level of the spinal cord to study physiopharmacological aspects of nociception, especially of inflammatory nociceptive processes.

GERDA

Groupe d'Études et de Recherches en Dermato-Allergologie
PARIS – Palais des Congrès – 5 au 7 octobre 2000

Dermato-allergo-pédiatrie
Pathologies allergiques des muqueuses

Organisation scientifique :

Dr Annick Pons-Guiraud/10, bd Malesherbes, 75008 Paris, France.
Tél. : 01 42 66 32 01/Fax : 01 42 66 32 13 – E-mail : Annick.Pons-guiraud@wanadoo.fr

Organisation technique :

MELTHEM/95, rue de Lourmel, 75015 Paris, France.
Tél. : 01 44 26 16 48/Fax : 01 45 54 36 21 – E-mail : melthem@club-internet.fr