

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	1
ABSTRACT	2
REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIÈRES	6
TABLE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX	9
LISTE DES ABRÉVIATIONS	11
INTRODUCTION	14
A - LA DOULEUR ET L'HOMME	15
1. Un concept universel et intemporel	15
a. À travers les époques	15
i. L'Antiquité	15
ii. Du Moyen Âge à la Renaissance	19
iii. L'Époque contemporaine (XVIII ^{ème} et XIX ^{ème} siècles)	22
b. De nos jours	26
i. Terminologie de la douleur	26
ii. Anatomie générale des voies de la douleur	28
iii. Les différents types de douleurs	30
iv. Impact socio-économique	33
2. Pharmacologie clinique du traitement de la douleur	34
a. Antalgiques	34
i. Palier 1 : antalgiques non morphiniques	34
ii. Palier 2 : antalgiques opioïdes faibles	37
iii. Palier 3 : antalgiques opioïdes forts	39
b. Co-antalgiques	43
3. Anatomophysiologie des voies sensorielles et nociceptives périphériques	45
a. Fibres sensorielles et nociceptives	46

i. Classification des fibres afférentes	47
ii. Fibres A α et A β	51
iii. Fibres A δ et C	53
b. Nociception et nocicepteurs	54
i. Nocicepteurs cutanés	57
ii. Nocicepteurs articulaires	59
iii. Nocicepteurs viscéraux	60
iv. Modulateurs biochimiques inflammatoires nociceptifs	61
c. Canaux ioniques : transduction et transmission du message douloureux	71
i. Thermotransduction chaude	73
ii. Thermotransduction froide	75
iii. Chémotransduction	79
B- LES CANAUX ASIC	82
1. Découverte et phylogénie	83
2. Propriétés des canaux ASIC	88
a. Propriétés structurales	88
i. Les différentes sous-unités ASIC	88
ii. Structure des canaux ASIC	91
b. Propriétés biophysiques et fonctionnelles	95
i. Sélectivité ionique	95
ii. Mécanismes d'activation et d'inactivation	96
iii. Diversité des courants	98
3. Pharmacologie et régulation des ASIC	103
a. Protéines partenaires	103
b. Modulateurs exogènes synthétiques	105
c. Modulateurs exogènes naturels	108
d. Modulateurs endogènes	116
e. Modulateurs physico-chimiques	122

4. Rôles des canaux ASIC dans la douleur	125
a. Distribution des ASIC dans les voies de la douleur	125
b. Douleur cutanée	126
c. Douleurs musculaire et articulaire	130
d. Douleur viscérale	134
e. Douleur migraineuse	139
RÉSULTATS	140
A- RÉGULATION DES CANAUX ASIC ₃ PAR DES LIPIDES INFLAMMATOIRES	141
1. Préface de l'étude	141
2. Article	144
B- THERMORÉGULATION DES CANAUX ASIC	149
1. Préface de l'étude	149
2. Résultats de l'étude	151
3. Conclusion de l'étude	167
DISCUSSION	168
A- NOUVEL ACTIVATEUR ENDOGÈNE D'ASIC ₃	170
B- ACTIVATION D'ASIC ₃ PAR LE FROID	175
CONCLUSION GÉNÉRALE	179
ANNEXE : PARTICIPATIONS AUX CONGRÈS	182
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	183

TABLE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX

Figure 1 : Théorie des humeurs	17
Figure 2 : Anatomie du système nerveux de Vésale, 1543	21
Figure 3 : Théorie de la douleur de l'Époque contemporaine	25
Figure 4 : Réponses à la douleur physiologique et physiopathologique	27
Figure 5 : Anatomie générale des voies perceptives de la douleur	29
Figure 6 : Classification de la douleur	30
Figure 7 : Échelle des antalgiques d'après l'OMS	42
Figure 8 : Classification des fibres afférentes	48
Figure 9 : Fibres nerveuses sensibles afférentes	50
Figure 10 : Nocicepteur polymodal	56
Figure 11 : Médiateurs inflammatoires et nocicepteur	63
Figure 12 : Hydrolyse des phospholipides membranaires	66
Figure 13 : Voies de production des lipides inflammatoires	70
Figure 14 : Échelle des températures corporelles	72
Figure 15 : Canaux TRP et thermoperception	77
Figure 16 : Superfamille des canaux ENaC/DEG	84
Figure 17 : Enregistrements des courants du "récepteur des protons"	86
Figure 18 : Modélisation de la structure d'une sous-unité ASIC1a	90
Figure 19 : Modélisation de la structure du canal ASIC1a de poulet	92
Figure 20 : Sites de fixation des protons et entrée sodique	94
Figure 21 : Cinétiques des courants ASIC homomériques	100
Figure 22 : Courant de fenêtre d'ASIC3	102
Figure 23 : Sites de fixation et effets des principaux modulateurs des canaux ASIC	115
Figure 24 : GMQ, douleur et ASIC3	128
Figure 25 : Modèle de douleur musculaire chronique	132
Figure 26 : ASIC périphériques et douleur	138

Figure 27 : Résumé graphique de l'article	143
Figure 28 : Hyperalgie mécanique musculaire secondaire	146
Figure 29 : Hyperalgie mécanique articulaire secondaire	148
Figure 30 : Sensibilité thermique des canaux ASIC3	150
Figure 31 : Sensibilité thermique de l'inactivation des canaux ASIC	152
Figure 32 : Protocole de refroidissement par patch-clamp	154
Figure 33 : Activation par le froid des canaux ASIC3 à pH physiologique	156
Figure 34 : Activation et inactivation d'ASIC3	158
Figure 35 : Activation d'un courant froid dans les neurones DRG	160
Figure 36 : Test de la préférence de place : ASIC et froid sensoriel	162
Figure 37 : Test de la rampe froide : ASIC et froids sensoriels et nocifs	164
Figure 38 : Test d'immersion de la queue : ASIC et froid nocif	166
Figure 39 : Conclusion - activation d'ASIC3 par le froid	167
Figure 40 : Effets de la LPC et de la LPC NM sur la douleur aiguë	174
Figure 41 : Schéma de conclusion générale	181
Tableau 1 : Classification et implications des fibres sensibles afférentes	50
Tableau 2 : Classification et rôles des mécanorécepteurs	52
Tableau 3 : Propriétés électrophysiologiques des canaux ASIC	99
Tableau 4 : Partenaires protéiques intracellulaires des canaux ASIC	104
Tableau 5 : Modulateurs exogènes synthétiques des canaux ASIC	107
Tableau 6 : Relation température et pH	122

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-HT :	Sérotonine
AA :	Acide Arachidonique
AINS :	Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens
AKAP :	A Kinase Anchor Protein
ANO-1 :	ANOctamin-1
ANSM :	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
APETx2 :	<i>AnthoPleura Elegantissima</i> ToXine 2
ASIC :	Acid-Sensing Ion Channel
Asp :	Aspartate
ATP :	Adénosine TRIPhosphate
BNC :	Brain Na ⁺ Channel
Ca ²⁺ :	Calcium
Ca _v :	Voltage-gated Ca ²⁺ channel
Cd ²⁺ :	Cadmium
CFA :	Complete Freund's Adjuvant
CGRP :	Calcitonin Gene-Related Peptide
CIPP :	Channel Interacting PDZ domain-containing Protein
COX :	Cyclo-OXYgénases
DCE :	Dépression Corticale Envahissante
DEG :	DEGénérines
DOP :	Delta Opioid Receptor
DRASIC :	Dorsal Root ASIC
DRG :	Dorsal Root Ganglion
EC ₅₀ :	Half maximal Effective Concentration
ENaC :	Epithelial Na ⁺ Channel
FaNaC :	FMRF-amide-activated Na ⁺ Channel
FMRF :	Phénylalanine-Méthionine-Arginine-Phénylalanine
GABA :	Gamma-AminoButyric Acid
GAS :	Glycine-Alanine-Sérine
Gd ³⁺ :	Gadolinium
Glu :	Glutamate
GMQ :	2-Guanidine-4-MethylQuinazoline
H ⁺ :	Hydrogène
Hcr :	<i>Heteractis crista</i>
Hi :	<i>Hadronyche infensa</i>
HIS :	HISTamine
His :	Histidine
Hm3a :	<i>Heteroscodra maculata</i> 3a
HPETE :	acide HydroxyPeroxyEicosaTétraEnoïque
IASP :	International Association for the Study of Pain

IC ₅₀ :	Half maximal Inhibitory Concentration
IL-1 β :	InterLeukine-1 β
IL-6 :	InterLeukine 6
ip :	voie intrapéritonéale
IP ₃ :	Inositol TRIPhosphate
IPMC :	Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire
iv :	voie intraveineuse
K ⁺ :	Potassium
K ₂ P :	TWO-Pore K ⁺ channel
KD :	Knock-Down
Kir :	Inward-Rectifier K ⁺ channel
KO :	Knock-Out
KOP :	Kappa Opioid Receptor
Li ⁺ :	Lithium
LOX :	LipOXygénases
LPA :	Acide LysoPhosphatidique
LPC :	LysoPhosphatidylCholine
LPC NM :	LysoPhosphatidylCholine Non Métabolisable
LPE :	LysoPhosphatidylEthanolamine
LPI :	LysoPhosphatidylInositol
LPL :	LysoPhosphoLipides
LPS :	LysoPhosphatidylSérine
LT :	LeucoTriènes
MAGI :	Membrane-Associated Guanylate kinase
MDEG :	Mammalian DEGenerin
MEC :	Mechano-Electrical transduction Channel
Mg ²⁺ :	Magnésium
MitTx	<i>Micrurus tener</i> Toxine
MOP	Mu Opioid Receptor
Na ⁺ :	Sodium
Na _v :	Voltage-gated Na ⁺ channel
NGF	Nerve Growth Factor
NHERF	Na ⁺ /H ⁺ Exchanger Regulatory Factor
Ni ²⁺ :	Nickel
NMDA :	N-Methyl-D-Aspartate
NO :	Oxyde Nitrique
NOP :	Nociceptin Opioid Receptor
NPFF :	NeuroPeptide FlfqprFamide
NPSF :	NeuroPeptide SlaapqrFamide
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
P ₂ X :	Récepteur ionotrope à l'ATP
PA :	Potentiel d'Action
PAF :	Facteur d'Activation Plaquettaire

Pb ²⁺ :	Plomb
PcTx1 :	Psalmotoxine-1
PG :	Prostaglandines
pH :	Potentiel Hydrogène
PhcTx :	<i>Phymanthus crucifer</i> Toxine
PICK :	Protein Interacting with C Kinase
PIST :	PDZ domain protein Interacting Specifically with TC10
PKA :	Protéine Kinase A
PKC :	Protéine Kinase C
PSD-95 :	PostSynaptic Density protein 95
RA :	Rapidly Adapting
RCPG :	Récepteurs Couplés aux Protéines G
SA :	Slowly Adapting
SICM :	Scanning Ion Conductance Microscopy
siRNA :	Small Interfering RiboNucleic Acid
SNAP :	S-Nitroso-AcetylPenicillamine
SP :	Substance P
SPASIC :	SPinal cord ASIC
sPLA2 :	Secreted PhosphoLipase A2
TASK :	TWIK-related Acid-Sensitive K ⁺ channel
TM :	TransMembranaire
TNaC :	Testis Na ⁺ Channel
TNF- α :	Tumor Necrosis Factor α
TRAAK :	TWIK-Related Arachidonic Acid K ⁺ channel
TREK :	TWIK-RElated K ⁺ channel
TRESK :	TWIK-RElated Spinal cord K ⁺ channel
TrkA :	Récepteur à activité Tyrosine Kinase A
TRPA :	Transient Receptor Potential Ankyrin
TRPC :	Transient Receptor Potential Canonical
TRPM :	Transient Receptor Potential Melastatin
TRPV :	Transient Receptor Potential Vanilloid
TTX :	TétrodoToXine
TX :	ThromboXanes
Ugr :	<i>Urticina grebelnyi</i>
VGKC :	Voltage-Gated K ⁺ Channel
WDR :	Wide Dynamic Range
Zn ²⁺ :	Zinc

INTRODUCTION

A- LA DOULEUR ET L'HOMME

1. Un concept universel et intemporel

a. À travers les époques

Depuis tout temps, l'histoire de l'Homme et celle de la douleur sont étroitement liées. La signification de la douleur et son traitement évoluent au fil des civilisations. Autrefois, notion abstraite et religieuse, elle devient concrète et physiologique avec l'évolution des connaissances et les avancées de la médecine moderne.

Les plus anciennes traces évoquant la douleur et son traitement datent de plusieurs milliers d'années avant Jésus-Christ dans des zones géographiques disparates (Pérou, Asie Mineure, Inde et Chine). Les premiers témoignages à propos de son traitement relatent l'utilisation d'opium et de feuilles de coca, notamment contre les douleurs dentaires. Les Egyptiens recouraient à l'électricité pour soulager certaines douleurs articulaires en utilisant des poissons électriques (poisson-chat électrique du Nil et torpille ocellée).

Dans les civilisations primitives, la douleur causée par un dommage physique visible (*p. ex.*, blessure de guerre) est bien comprise, alors qu'une douleur invisible liée à une maladie interne, l'est beaucoup moins. Les douleurs internes étaient mystiques, elles semblaient être causées par l'intrusion d'un démon ou de fluides magiques dans le corps humain. Les traitements contre les douleurs invisibles étaient alors prodigués par des « médecins prêtres », des shamans et des sorciers. Ils avaient pour but d'extraire hors du corps la substance maléfique lors de cérémonies religieuses. Il faut attendre la civilisation gréco-romaine, pour que la douleur ne soit plus perçue comme quelque chose de divin mais comme un phénomène naturel (Sabatowski et al., 2004).

i. L'Antiquité

Durant l'Antiquité, d'abord en Grèce puis à Rome, les « médecins prêtres » sont remplacés par des « médecins philosophes » qui démystifient la douleur. En Grèce, deux écoles s'opposent. Pour Alcméon, Démocrite et Hippocrate la douleur est une sensation dont le centre de perception est le cerveau (Sabatowski et al., 2004).

Alors que pour Platon et Aristote la douleur est une émotion au même titre que le plaisir et dont le cœur en est le siège (Perl, 2007).

Alcméon (V^{ème} siècle av. J.C.) est considéré comme un des premiers à avoir pratiqué des vivisections sur animaux pour poser les bases de l'anatomie (Lloyd, 1975). Il faut attendre deux siècles plus tard, à Alexandrie, pour que de nombreuses dissections détaillées (plus de 600), réalisées par Hérophile et Erasistrate, permettent de décrire avec plus de précisions l'anatomie du cerveau. Alcméon décrit le cerveau comme l'organe central des sensations et distingue déjà deux sortes de nerfs. Il fait le distinguo entre ceux permettant la perception des sensations et ceux permettant le mouvement. Un demi-siècle plus tard la théorie des humeurs est développée par Démocrite (460-370 av. J.C.) et popularisée par Hippocrate (460-370 av. J.C.) dans le « *Corpus hippocratique* ».

Cette théorie qui perdure jusqu'au XIX^{ème} siècle, présente la douleur comme la conséquence d'un déséquilibre entre les 4 humeurs que sont : le sang (l'air), le phlegme (l'eau), la bile noire (terre) et la bile jaune (feu) [**Figure 1**]. Pour la première fois, la douleur apparaît comme un phénomène naturel qui se détache complètement de l'aspect religieux. Elle n'est plus prise en compte comme une entité singulière mais comme un élément utile dans un processus complexe : la maladie (Sabatowski et al., 2004 ; Lazorthes, 2009).

Mais à cette époque et pour les siècles à venir, en Grèce, la théorie la plus populaire est celle de Platon (428-348 av. J.C.) et d'Aristote (384-322 av. J.C.). Pour eux, le cœur est le centre de la perception des émotions et de toutes les fonctions vitales. Le cerveau ne sert qu'à refroidir la chaleur issue du cœur et à réguler le sommeil. D'après leur théorie, l'excès de chaleur entraîne une augmentation de la sensibilité tactile responsable de la sensation douloureuse. A la différence d'Alcméon, Platon et Aristote ne pratiquent pas et ne reconnaissent pas les avancées anatomiques faites grâce aux dissections, car la dissection des défunts n'est pas acceptée par la société athénienne (Sabatowski et al., 2004 ; Perl, 2011).

A Rome, il faut attendre le 1^{er} siècle av. J.C. pour voir la médecine se développer. Pour la première fois, l'inflammation accompagnant l'infection d'une plaie est décrite et caractérisée par Celse, un médecin grec arrivé à Rome. Il énonce sa théorie sur l'inflammation dans le « quadrilatère de Celse » : *rubor*, *tumor*, *calor* et *dolor*, sont quatre signes correspondant respectivement à la rougeur, l'œdème, la chaleur et la douleur, caractéristiques du processus inflammatoire (Lazorthes, 2009).

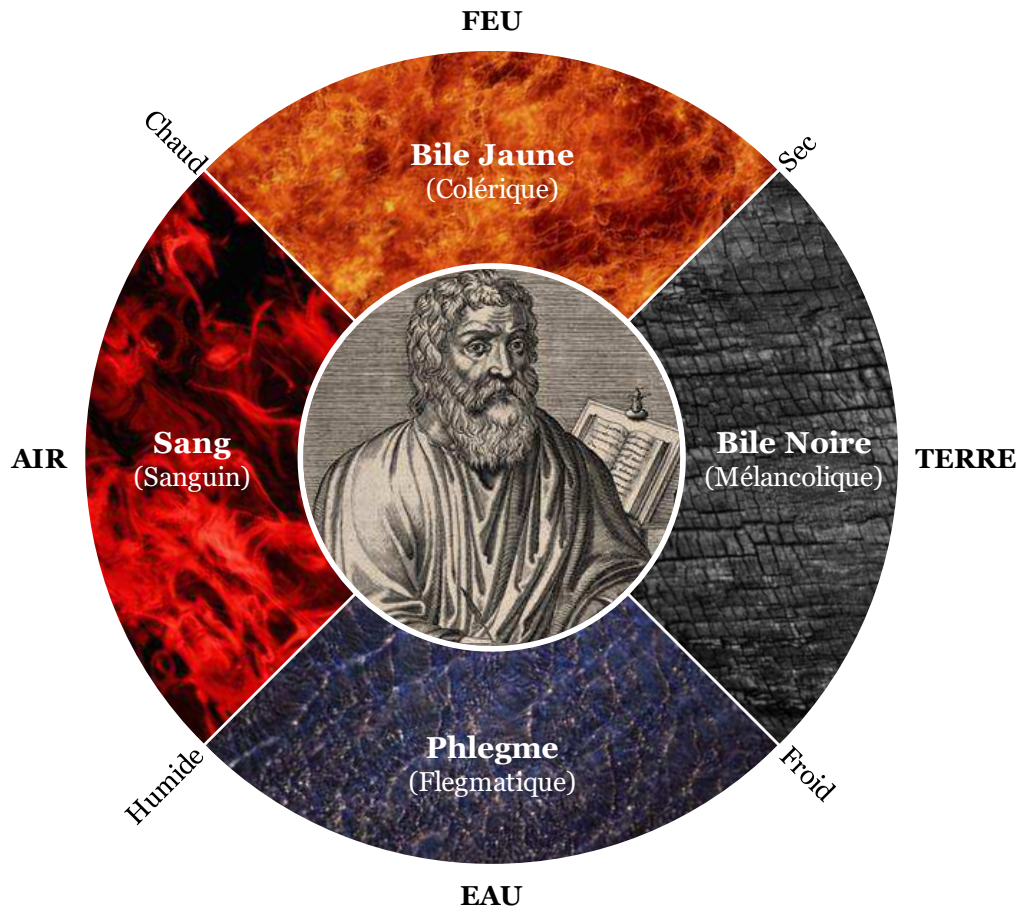


Figure 1 : Théorie des humeurs.

Diagramme de la théorie des humeurs, popularisée par Hippocrate au IV^{ème} siècle av. J.C. L'équilibre des quatre humeurs (sang, bile jaune, bile noire, phlegme) définit le tempérament et l'état de santé de l'individu. Selon les saisons, l'une ou l'autre des humeurs prédomine. (D'après Sabatowski et al., 2004 ; Lazorthes, 2009).

Deux siècles plus tard, le cerveau est rétabli comme le centre des sensations par Galien (131-201 apr. J.C.), le médecin de l'empereur Marc-Aurèle. Il décrit le cerveau comme le centre du système nerveux central connecté aux nerfs périphériques. Bien qu'il associe la douleur au toucher et à des irritations externes, il pense qu'elle peut aussi résulter de sensations internes. Selon lui, la sensation douloureuse est accompagnée d'une perception consciente, qui nécessite une communication entre l'organe affecté et le cerveau via un fluide se propageant dans le corps. Pour la première fois la douleur est définie comme un signal d'alarme permettant la prise de conscience par l'individu d'un changement de son équilibre interne ou externe. En plus des poissons électriques et de l'opium déjà utilisés par d'anciennes civilisations, Galien développe l'utilisation d'autres plantes à alcaloïdes (*p. ex.*, mandragore, belladone, jusquiame).

Durant plusieurs siècles, les découvertes de Galien n'eurent pas le rayonnement escompté, car de part leur popularité, la philosophie d'Aristote et de Platon qui place le cœur au centre de toutes les perceptions, resta la plus communément acceptée (Sabatowski et al., 2004 ; Perl, 2007).

ii. Du Moyen Âge à la Renaissance

Au Moyen Âge, alors que l'Occident est plongé dans l'obscurantisme, en Orient les ouvrages des philosophes et médecins de l'Antiquité sont traduits en arabe. On assiste à l'expansion du monde arabo-musulman, d'où viennent les avancées médicales majeures de cette époque (Lazorthes, 2009).

En Occident, la religion est omniprésente. A nouveau, la douleur est l'œuvre de Dieu, elle est associée au péché. En se basant sur l'Ancien Testament, le Christianisme veut pousser au dépassement de la souffrance. La douleur de la crucifixion du Christ est présentée comme salvatrice et rédemptrice (Ribau et Duchange, 2003 ; Sabatowski et al., 2004). L'église catholique très conservatrice paralyse les avancées de la science et de la médecine. Elle s'oppose aux vivisections, aux dissections des cadavres et interdit la diffusion du savoir issu de la civilisation gréco-romaine. Les prières et le silence remplacent les médecins pour supporter les épreuves divines, les traitements pour soulager la douleur sont assimilés à de la magie et sont donc par conséquent proscrits.

Dans son œuvre « le Canon », Avicenne (980-1037 apr. J.C.) un philosophe, scientifique et médecin arabe, reprend les idées de Galien et confirme le lien entre le système nerveux, les sensations et la conscience. Mais, il se détache des médecins de l'Antiquité en présentant la douleur comme un sens à part entière, bien distinct du toucher. Il démontre qu'un patient atteint d'une pathologie peut perdre le sens du toucher tout en conservant la perception douloureuse et inversement (Ribau et Duchange, 2003 ; Perl, 2007 ; Perl, 2011).

En Occident jusqu'à la fin du Moyen Âge, l'Eglise gardera la main mise sur la science. Elle s'appuie sur les guerres, les épidémies et les famines qui frappent l'Occident pour renforcer le sens divin donné à la souffrance. Ces événements sont vécus comme des manifestations de la colère de Dieu (Lazorthes, 2009).

A la Renaissance, l'humanisme est la pensée dominante. L'homme se préoccupe en priorité de lui et non plus de Dieu, la douleur perd sa valeur expiatoire. C'est à cette époque que reprennent les avancées anatomiques et chirurgicales.

Au début du XVI^{ème} siècle, les papes Jules II et Clément VII autorisent peu à peu les dissections sur l'homme. On assiste au renouveau de l'anatomie, notamment grâce à André Vésale (1514-1564) qui corrige les erreurs anatomiques faites par Galien.

Vésale dissèque le corps humain partie par partie, alors que Galien n'avait disséqué que des singes et transposé ses observations à l'homme. Dans son ouvrage « *De humani corporis fabrica libri septem* » il décrit de manière détaillée l'anatomie du système nerveux périphérique et du cerveau et fait le distinguo entre la substance blanche et la substance grise [**Figure 2**] (Lazorthes, 2009).

C'est à cette période que débute l'ère de la chirurgie moderne, notamment grâce à Ambroise Paré (1509-1590), chirurgien sur les champs de bataille. Il prône la ligature vasculaire et la compression pour limiter les douleurs chirurgicales. C'est lui qui décrit pour la première fois la douleur du membre fantôme suite à une amputation (Ribau et Duchange, 2003).

Au début du XVII^{ème} siècle, selon Descartes (1596-1650), la douleur « n'est ni plus ni moins qu'un système d'alarme, dont la seule fonction est de signaler une lésion corporelle ». Il a une vision mécanique du corps, dans lequel les nerfs sont comme des cordes que l'on peut remuer ou tirer. Pour décrire la relation entre les nerfs et le cerveau, il utilise une métaphore dans laquelle un nerf est assimilé à une corde et le cerveau à la cloche d'une église. Dans ses méditations métaphysiques (méditation sixième), il décrit les voies de la douleur en prenant l'exemple d'une douleur au pied. Pour lui, la douleur se transmet grâce aux nerfs jusqu'au cerveau via la moelle épinière : « ces nerfs doivent passer par la jambe, par la cuisse, par les reins, par le dos et par le col, pour s'étendre depuis le pied jusqu'au cerveau » (Descartes, 1664). La théorie de Descartes est le point de départ des idées développées au XIX^{ème} siècle.

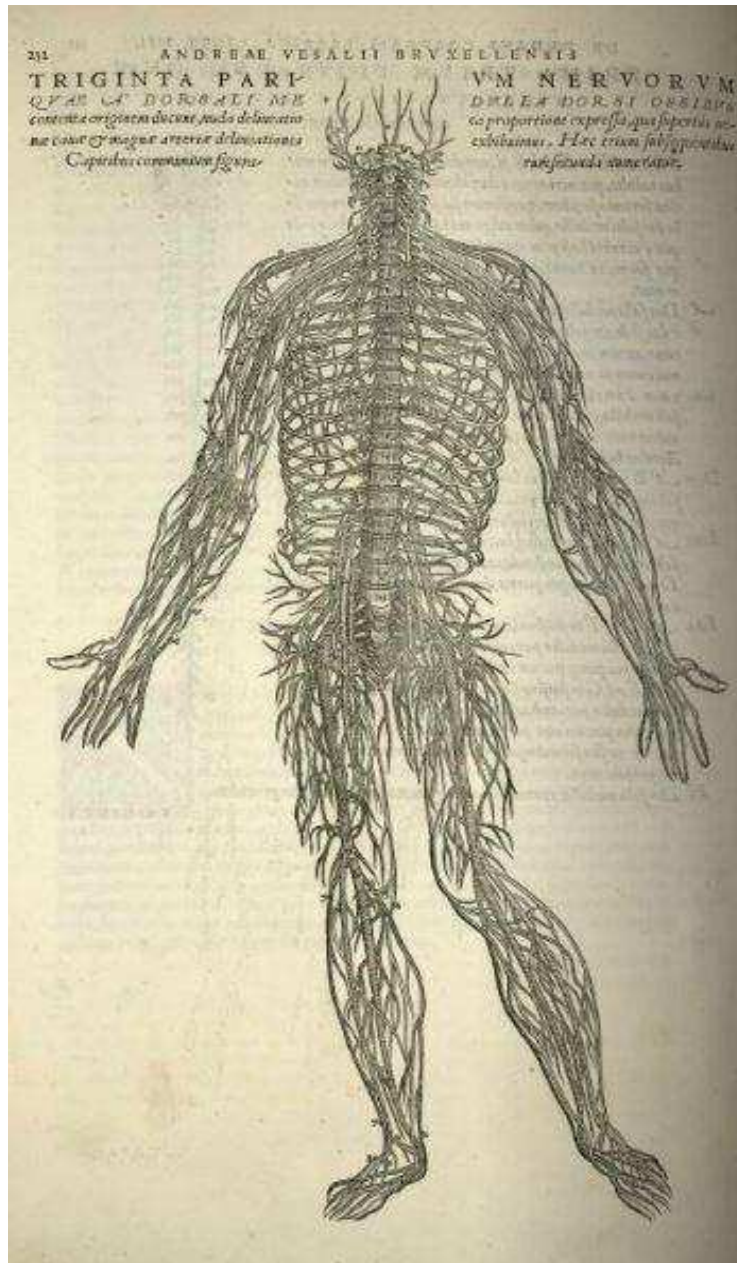


Figure 2 : Anatomie du système nerveux de Vésale, 1543.

Dessin anatomique détaillé du système nerveux périphérique.

iii. L'Epoque contemporaine (XVIII^{ème} et XIX^{ème} siècles)

Physiologie

Durant cette époque, de multiples découvertes sont faites et les grandes théories sur la douleur sont énoncées.

Au début du XIX^{ème} siècle, Sir Charles Bell puis François Magendie, démontrent que les racines dorsale et ventrale des nerfs spinaux remplissent des fonctions différentes. Ils attribuent la responsabilité de la contraction musculaire à la racine ventrale et la fonction sensitive à la racine dorsale (Perl, 2007).

Dans les années 1840, Johannes Peter Müller expose son concept sur la spécificité des nerfs sensitifs et Emil du Bois-Reymond, élève de Müller, décrit la nature électrochimique de l'influx nerveux. Pour Müller, la sensation ne dépend pas de la nature de la stimulation mais du nerf stimulé lui-même. Un même type de stimulation peut produire différentes sensations et inversement (Perl, 2007).

En 1858, Moritz Schiff démontre grâce à des lésions de la moelle épinière que la sensibilité tactile et la douleur mettent en jeu des voies différentes. Il confirme ainsi les théories d'Avicenne datant du XI^{ème} siècle (Perl, 2007).

Durant cette période sont également mis en évidence les récepteurs cutanés du toucher (mécanorécepteurs) que sont : les corpuscules de Pacini (1835), les corpuscules de Meissner (1853), les disques de Merkel (1875) et les corpuscules de Ruffini (1893) (Moayed et Davis, 2013).

A la fin du XIX^{ème} siècle, Magnus Blix et Alfred Goldscheider observent qu'il existe des régions cutanées dédiées au chaud, au froid et à la pression. Max Von Frey confirme ces travaux et émet l'idée qu'il existe des structures spécifiques pour chaque sensation, y compris pour la douleur. Il faut attendre 1906 pour que Charles Scott Sherrington suggère que toutes les modalités capables d'endommager les tissus peuvent être nocives. Sherrington est à l'origine des termes de nociception et de nocicepteurs dont les définitions seront énoncées plus loin dans ce manuscrit (Sabatowski et al., 2004 ; Perl 2007 ; Perl 2011 ; Moayed et Davis, 2013).

Durant le XX^{ème} siècle, de nombreuses études s'intéressent aux propriétés des fibres nerveuses sensorielles et nociceptives. Cette partie sera détaillée dans le chapitre « Anatomophysiologie des voies sensorielles et nociceptives périphériques ».

Au cours de cette période, quatre grandes « Théories de la douleur » vont se développer [**Figure 3**] :

- Théorie de la spécificité [**Figure 3A**] : La douleur emprunte une voie précise jusqu'à une région sensorielle spécifique du cerveau, grâce à des fibres spécialisées qui ne sont activées que par des stimuli nocifs. Cette théorie est notamment soutenue par Bell, Muller et Von Frey.
- Théorie de l'intensité (Wilhelm Erb, 1874) [**Figure 3B**] : Les voies sensorielles et nociceptives sont les mêmes. La différence de perception résulte de l'intensité de la stimulation, chaque stimulus peut être douloureux s'il atteint un seuil suffisamment élevé.
- Théorie du pattern [**Figure 3C**] : Les neurones répondent dans une gamme dynamique d'intensité de stimulation. Chaque neurone ne s'active ni de la même manière, ni à la même intensité, la douleur résulte de la sommation de ces activités. C'est le pattern d'activité des différents neurones qui renseignent sur la localisation et la modalité du stimulus. Cette théorie défendue par Blix et Goldscheider complète la théorie de l'intensité.
- Théorie du portillon (« Gate control ») développée par Ronald Melzack et Charles Patrick Wall en 1965 [**Figure 3D**]. Elle fait la jonction entre la théorie de la spécificité et la théorie du pattern. C'est la première à intégrer à la fois une composante physiologique et une composante psychique. Selon cette théorie, la douleur est déterminée par l'interaction de trois systèmes. Elle nécessite une perception périphérique grâce aux fibres de petit (C) et de gros (A) diamètres, une modulation au niveau de la moelle épinière et des contrôles descendants issus des régions supraspinales. Au niveau de la moelle épinière, Melzack et Wall proposent que la substance gélatineuse située dans la corne dorsale serait la structure jouant le rôle de portillon. C'est là que se ferait la modulation des informations

sensorielles entrantes, entre le neurone afférent primaire et les cellules de transmission présentes dans la moelle épinière. L'activation des fibres de gros diamètre inhibe/ferme le portillon, alors que l'activation des fibres de petit diamètre ouvre le portillon. L'ouverture de la porte engendre l'activation d'une voie permettant l'intégration du message douloureux.

Bien que quelque peu imprécise, la théorie du portillon est la base des études modernes menées dans le domaine de la douleur (Sabatowski et al., 2004 ; Perl 2007 ; Perl 2011 ; Moayed et Davis, 2013).

Pharmacologie

L'époque contemporaine est une période faste pour le développement des traitements contre la douleur et la généralisation de l'anesthésie. La pharmacologie de l'époque contemporaine sera développée plus en détail dans le chapitre « Pharmacologie clinique du traitement de la douleur ».

Le XIX^{ème} siècle est marqué par l'expansion de l'anesthésie générale puis locale. En 1846, Robert Liston réalise la première opération sous anesthésie générale à l'éther. Durant les années suivantes, l'utilisation d'un second anesthésique volatil, le chloroforme, est popularisée par John Snow. En 1885, l'ophtalmologiste Carl Koller, réalise la première opération oculaire sous anesthésie locale. Il utilise pour cela une molécule isolée 25 ans auparavant, la cocaïne. Depuis, de nouveaux anesthésiques locaux ont été élaborés tels que la procaine et la lidocaïne (Sabatowski et al., 2004).

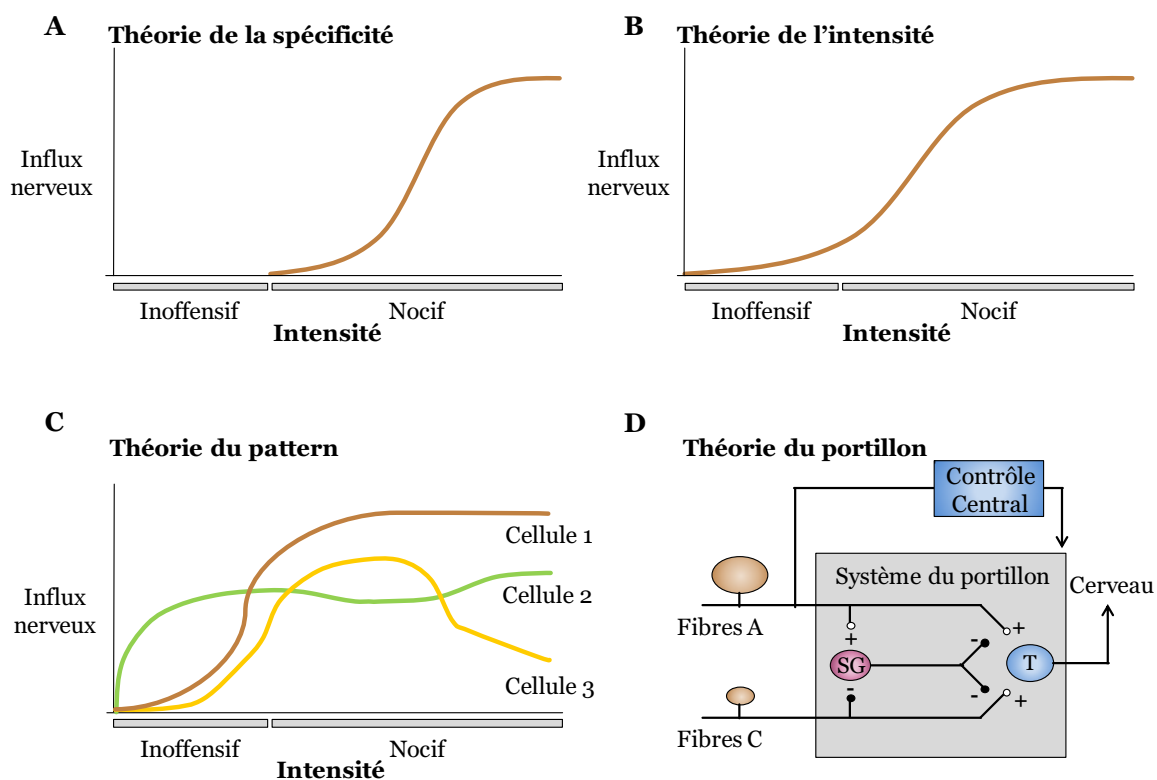


Figure 3 : Théories de la douleur de l'Époque contemporaine.

A. Théorie de la spécificité. Des organes sensoriels spécialisés, les nocicepteurs, ont un seuil d'activation proche du seuil de douleur. Leur activité augmente plus l'intensité de la stimulation nocive est forte. Ces neurones afférents ont des connexions sélectives avec des neurones de projection de la moelle épinière et du tronc cérébral.

B. Théorie de l'intensité. Les organes sensoriels périphériques ne sont pas différenciés en fonction de leur seuil d'activation. Les fibres afférentes transduisent les stimuli non-nocif en générant un certain niveau d'activité, alors que les stimuli nocifs induisent une intensité de décharge plus élevée.

C. Théorie du pattern. Les organes sensoriels somatiques ont une large gamme de sensibilité. Les neurones afférents répondent de manière individuelle avec une relation à l'intensité qui est propre à chacun. Le mode et le lieu de stimulation sont indiqués par la composition des fibres du pattern pour une région donnée du corps. Les neurones de projection centrale codent pour le lieu et la nature de la stimulation en fonction du pattern et de la distribution des décharges.

D. Théorie du portillon. Les neurones afférents ont un large spectre de seuil d'activation. Les nocicepteurs spécialisés et les voies centrales dédiées à la douleur n'existent pas. Suite à une stimulation prolongée, les fibres afférentes de gros diamètre (fibres de type A) s'adaptent plus rapidement que les fibres de faibles diamètre (fibre de type C). Dans la substance gélatineuse de la corne dorsale de la moelle épinière, il existe une porte présynaptique entre le neurone afférent et le neurone de projection. Cette porte est contrôlée par la balance d'activité des fibres A et C. Quand l'activité des fibres C l'emporte, la porte s'ouvre, permettant l'activation des neurones de projection. Un contrôle descendant, issu du système nerveux central pourrait moduler le portillon.

Abréviation : SG : substance gélatineuse ; T : neurone de projection. (D'après Perl, 2007).

b. De nos jours

i. Terminologie de la douleur

La douleur est définie depuis 1979 par l'Association internationale pour l'étude de la douleur ou IASP (« International Association for the Study of Pain »), comme « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite en termes d'un tel dommage ».

On parle donc de douleur lorsque l'information est intégrée et interprétée au niveau du cerveau, alors que lorsqu'on s'intéresse simplement à la perception d'un stimulus potentiellement nocif, on parle de nociception.

La douleur est avant tout une expérience personnelle et subjective, propre à chacun de nous. Bien qu'ayant généralement pour origine une lésion tissulaire, elle dépend aussi de nombreux facteurs physiques (*p. ex.*, âge et hormones) et psychiques (*p. ex.*, fatigue, stress, anxiété). La composante psychique complexifie davantage sa compréhension et son traitement. D'autant plus qu'il est possible de ressentir une douleur sans qu'il n'existe de quelconque lien avec une atteinte de l'intégrité physique (Institut UPSA de la douleur). Dans la suite de ce mémoire, je me focaliserai essentiellement sur la composante physique de la douleur.

Une stimulation des terminaisons nerveuses périphériques entraîne, selon son intensité, une perception qui peut être, soit sensorielle, soit douloureuse. Ainsi, une stimulation de faible intensité est considérée comme sensorielle (non-nocive) jusqu'à un certain seuil, au-delà duquel elle devient nociceptive (nocive). Le seuil de perception de la douleur correspond à une gamme restreinte d'intensité qui est commune pour tous les individus. Mais, bien que ce seuil soit quasi semblable pour tous, il n'est pas immuable. En effet, en cas de lésion ou de pathologie, il peut être décalé vers des intensités plus faibles (terminologie de l'IASP).

Le décalage de ce seuil peut engendrer deux phénomènes nommés allodynie et hyperalgie. L'allodynie correspond à une douleur provoquée par un stimulus habituellement indolore. Par exemple, une pression cutanée modérée qui théoriquement n'engendre pas de douleur sera perçue comme douloureuse en présence d'un coup de soleil. Alors que, l'hyperalgie est définie par une réponse exacerbée à une stimulation normalement faiblement douloureuse [**Figure 4**] (terminologie de l'IASP).

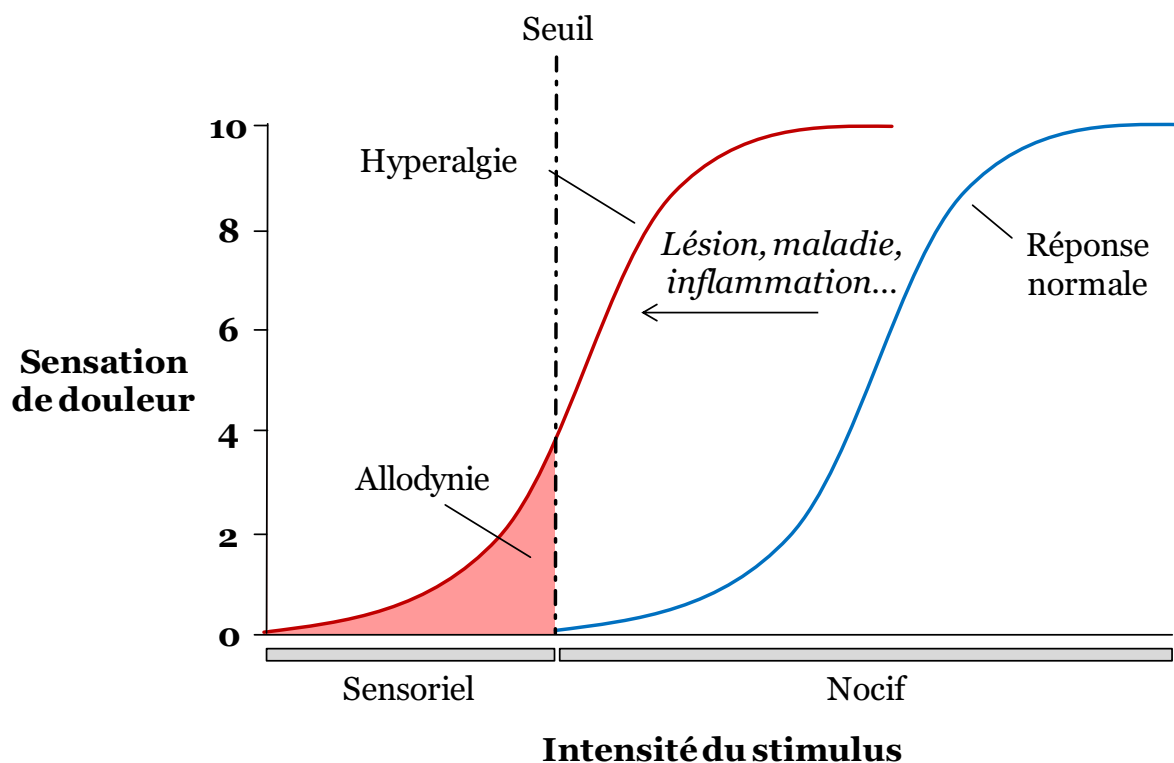


Figure 4 : Réponses à la douleur physiologique et physiopathologique.

La courbe bleue représente la réponse « normale » à la douleur. A partir d'un certain seuil, une stimulation devient douloureuse, plus elle s'intensifie plus la douleur ressentie est forte. En cas de lésion ou de maladie, cette courbe est décalée vers des intensités de stimulations plus faibles. Un stimulus normalement indolore peut alors être perçu comme douloureux, c'est une allodynie. En plus de l'allodynie, il peut y avoir une hyperalgie, qui consiste en une réponse fortement exacerbée à une stimulation normalement faiblement douloureuse. (D'après Gottschalk et Smith, 2001).

ii. Anatomie générale des voies de la douleur

Le cheminement de l'information douloureuse se fait depuis les nerfs périphériques jusqu'à l'encéphale via la moelle épinière. En retour, depuis l'encéphale partent des contrôles descendants qui vont moduler le message douloureux.

En périphérie, le stimulus douloureux active un neurone de premier ordre spécialisé dans la détection des stimuli nocifs, nommé nocicepteur. Le corps cellulaire du nocicepteur se trouve dans un renflement situé à proximité de la colonne vertébrale appelé ganglion rachidien ou DRG (« dorsal root ganglion »). Pour la face, les corps cellulaires des nocicepteurs sont situés dans les ganglions trigéminaux.

Le neurone de premier ordre est dit pseudo-unipolaire car il ne possède qu'un seul prolongement axonal qui se divise rapidement en deux branches et qui constitue plus de 99% du neurone (Devor, 1999). Une des deux branches de l'axone rejoint la périphérie pour se terminer par un récepteur périphérique. L'autre branche rallie la moelle épinière via sa racine dorsale et sa corne dorsale (ou le tronc cérébral). Au niveau de la moelle épinière, le nocicepteur fait synapse avec un neurone de second ordre ou neurone de projection [**Figure 5**]. Ces neurones de projection vont permettre de faire remonter l'information jusqu'aux structures supraspinales via 5 voies (faisceaux spino-thalamique, spino-réticulaire, spino-mésencéphalique, cervico-thalamique et spino-hypothalamique). Le faisceau principal est le faisceau spino-thalamique qui relayent la majorité des informations nociceptives, notamment sur la localisation et l'intensité du stimulus, jusqu'au thalamus puis jusqu'à différentes régions corticales, notamment jusqu'au cortex somatosensoriel. Les neurones du faisceau spino-mésencéphalique projettent eux vers différentes structures dont la substance grise périaqueducale et l'amygdale. Ce faisceau est donc important pour la composante affective de la douleur. En réponse, des contrôles descendants partent essentiellement du tronc cérébral pour inhiber ou moduler l'intégration du signal nociceptif au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (Millan, 1999 ; Basbaum et al., 2009 ; Ossipov et al., 2010).

Lors de ma thèse j'ai focalisé mes recherches sur la perception de la douleur au niveau du système nerveux périphérique. De ce fait, je développerai essentiellement cette partie, en laissant de côté la partie centrale.

Organe périphérique

Moelle épinière

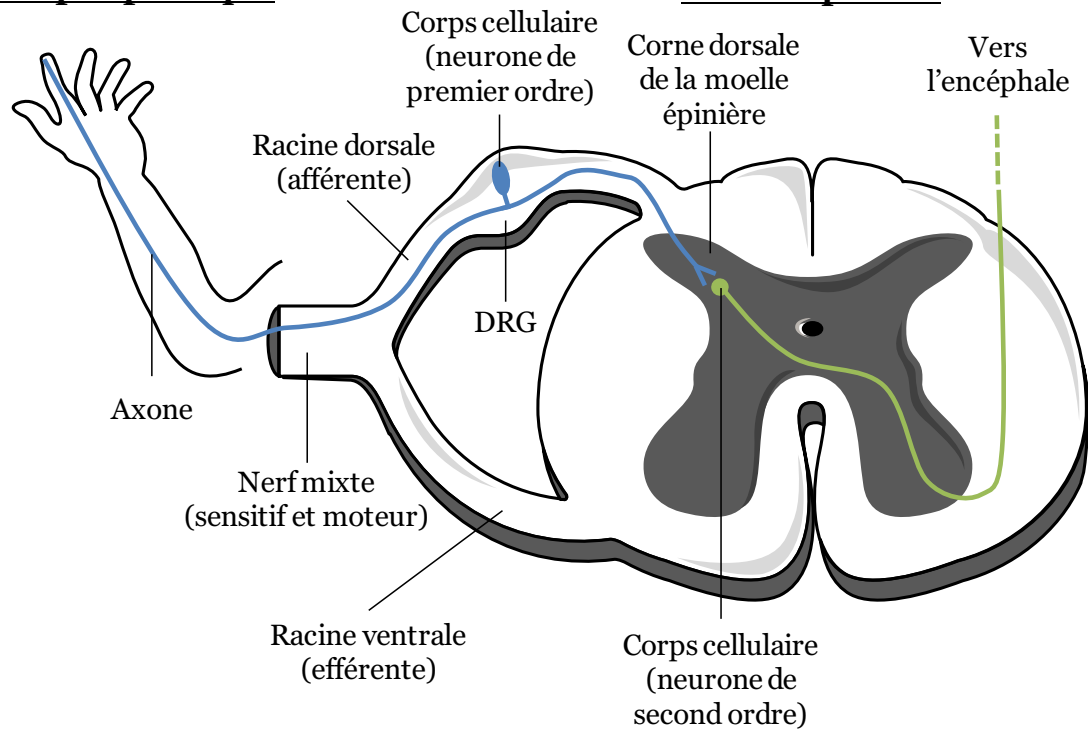


Figure 5 : Anatomie générale des voies perceptives de la douleur.

Le nocicepteur est un neurone de premier ordre (en bleu) spécialisé dans la détection des stimuli nocifs. Son corps cellulaire est situé dans le ganglion rachidien (DRG) et son prolongement axonal se divise en deux branches. La branche périphérique rejoint un organe périphérique, alors que la branche centrale rejoint la corne dorsale de la moelle épinière pour faire synapse avec un neurone de second ordre (en vert). Ce neurone de second ordre est un neurone de projection qui va permettre l'acheminement du message douloureux jusqu'aux structures supraspinales. (D'après Gardner et Johnson, 2013).

iii. Les différents types de douleurs

La douleur où plutôt les douleurs, peuvent être classées selon leur durée, en deux grandes familles. On distingue, les douleurs aiguës ou physiologiques (*i.e.*, durée inférieure à 3 mois d'un point de vue clinique) et les douleurs chroniques ou pathologiques (*i.e.*, durée supérieure à 3 mois) [**Figure 6**]. Outre leur différence de persistance, leurs fonctions sont elles aussi différentes. La douleur aiguë a un rôle protecteur, alors que les douleurs chroniques n'ont pas de rôle essentiel et résulte de dysfonctionnements physiques et/ou de perturbations psychiques (« Classification of chronic pain », IASP).

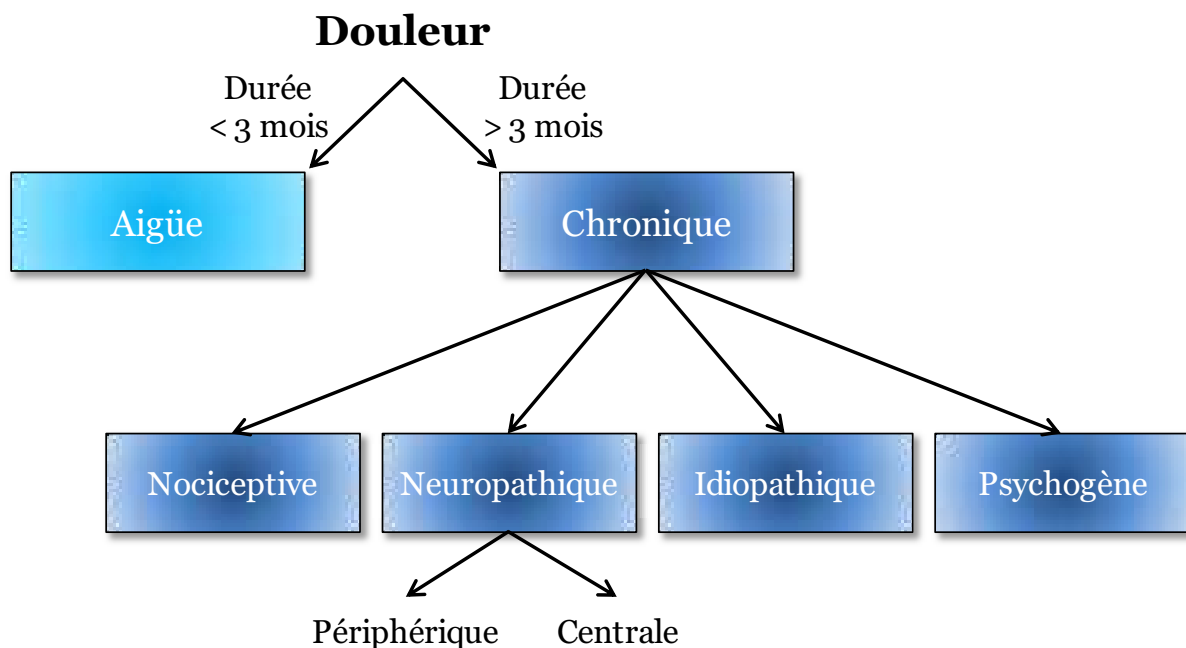


Figure 6 : Classification de la douleur.

En fonction de la durée et du mécanisme d'origine, il existe plusieurs types de douleurs. Selon sa durée, la douleur peut être qualifiée d'aiguë ou de chronique. Parmi les douleurs chroniques, il existe quatre sous-types de douleurs qui dépendent du mécanisme à l'origine de celle-ci.

Douleur aigüe

La douleur aigüe est une fonction vitale. C'est un signal d'alarme qui a pour but de préserver l'intégrité et le bon fonctionnement de l'organisme. Elle résulte de l'activation des nocicepteurs, qui sont des neurones sensoriels périphériques (neurones primaires) spécialisés dans la détection des stimuli potentiellement nocifs, qu'ils soient thermiques, mécaniques ou chimiques (Olesen et al., 2012). La douleur aigüe est donc une douleur qu'il ne faut surtout pas chercher à inhiber.

L'absence de perception de la douleur est une pathologie appelée insensibilité congénitale à la douleur qui est préjudiciable pour l'individu. En effet, cette insensibilité ne permet pas à l'individu d'être alerté d'une quelconque anomalie, l'empêchant ainsi de remédier à la cause du problème. Cette pathologie serait due à des mutations héréditaires conduisant à une absence totale de nocicepteurs, ou à une perte de fonction des canaux sodiques dépendants du potentiel $\text{Na}_v1.7$, ou bien encore à une mutation des canaux $\text{Na}_v1.9$ (Raouf et al., 2010 ; Leipold et al., 2013 ; Bennett et Woods, 2014).

A contrario de cette douleur salvatrice, les douleurs chroniques sont pathologiques et altèrent considérablement le bien-être de l'individu.

Douleurs chroniques

En 1947, la douleur chronique a émergé comme un phénomène à part entière, bien distinct de la douleur aigüe. En 1953, elle est définie par John Bonica, le fondateur de l'IASP, dans « The Management of Pain », comme une douleur qui persiste au-delà du temps attendu de guérison. Cette définition n'est plus valable aujourd'hui car de nombreuses pathologies sont considérées et traitées comme des douleurs chroniques alors que la guérison n'est pas achevée (« Classification of chronic pain », IASP).

Il existe différentes douleurs chroniques qu'il est possible de classer en fonction de l'organe touché ou du mécanisme d'origine.

Dans ce manuscrit j'ai choisi d'utiliser la classification en fonction du mécanisme d'origine qui comporte quatre sous-types de douleurs chroniques (« Aspects physiologiques de la douleur chronique » Institut UPSA de la douleur ; Peyron, 2013) :

- La douleur par excès de nociception (nociceptive) : C'est la forme de douleur chronique la plus répandue. C'est une douleur locale, elle est due à un surcroît de stimulation des nocicepteurs, sans lésion du système nerveux. Bien que locale, elle peut être à l'origine d'hyperalgies primaires (*i.e.*, au niveau de la lésion) qui résultent d'une sensibilisation périphérique, et/ou d'hyperalgies secondaires (*i.e.*, en dehors du foyer lésionnelle) qui résultent d'une sensibilisation centrale. Elle est notamment caractéristique d'une inflammation ou de l'arthrose. Cette douleur est généralement assez bien soulagée grâce à des antalgiques périphériques.
- La douleur neuropathique : Elle est définie par l'IASP comme « une douleur causée par une lésion ou une maladie du système nerveux somatosensoriel ». Selon l'origine de la lésion, elle peut être soit périphérique, soit centrale. Elle conjugue des douleurs continues à des douleurs transitoires pulsatiles. Ce type de douleur peut être provoqué par une amputation, une compression nerveuse ou une pathologie (*p. ex.*, diabète, cancer). Contrairement à la douleur par excès de nociception, les antalgiques, même morphiniques, ne parviennent pas à la soulager. L'utilisation de co-antalgiques (*p. ex.*, antiépileptiques et antidépresseurs) est préconisée pour traiter la douleur neuropathique.
- La douleur idiopathique ou dysfonctionnelle : La douleur ressentie est semblable aux deux douleurs précédemment décrites, mais aucune lésion des voies de la douleur n'est décelée. Elle serait d'origine fonctionnelle plutôt que lésionnelle. Cette douleur est typique des fibromyalgies et du syndrome du colon irritable. Les traitements proposés aux patients sont généralement non médicamenteux.
- La douleur psychogène ou « *sine materia* » : C'est une douleur sans étiologie, mais qui est associée à des facteurs psychologiques et émotionnels. Elle est par exemple éprouvée lors d'un deuil ou durant une dépression. Elle nécessite généralement une psychothérapie associée à des antidépresseurs.

Qu'elle soit d'origine physique et/ou psychique, qu'elle soit aiguë ou chronique, la douleur impacte fortement le quotidien de ceux qui la subissent et de leur entourage.

iv. Impact socio-économique

La douleur et son traitement sont des enjeux majeurs du XXI^{ème} siècle. Il est primordial de parvenir à mieux soulager les patients et diminuer le coût engendré pour la société. D'après l'enquête « les Français et la douleur » réalisée sur 2000 personnes pour Sanofi en 2014, 92% des Français ont souffert de douleurs (aigües ou chroniques) durant les 12 mois précédents. Au moment de l'enquête, 52% des personnes interrogées souffraient encore, dont 68% depuis plus d'un an (Sanofi, 2014).

La douleur est le premier motif de consultation en médecine générale. Elle représente 43% des consultations (Tajfel et al., 2002).

Une étude plus ancienne sur la prévalence des douleurs chroniques a été menée sur plus de 24 000 individus en 2007 (Bouhassira et al., 2007). Elle a révélé que 31.7% des Français souffraient de douleurs chroniques, dont 20% étaient d'intensités modérées à sévères. Les douleurs chroniques sont des douleurs handicapantes qui altèrent la qualité de vie personnelle et professionnelle des patients (Mick et al., 2013).

Outre l'impact humain, la douleur a une incidence économique très importante. En effet, d'après un rapport de 2014 de l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé), les antalgiques représentent à la fois la classe de médicaments et les quatre substances (paracétamol, ibuprofène, codéine en association, tramadol en association) les plus vendus en ville. Avec plus de 740 millions de boîtes vendues, ils représentent 22% de part de marché, générant ainsi plus d'un milliard d'euros de dépenses remboursées.

2. Pharmacologie clinique du traitement de la douleur

Dans le but de soulager la douleur, différentes méthodes dont l'efficacité est variable peuvent être employées. Dans ce chapitre j'ai choisi de ne pas aborder les traitements non médicamenteux, qu'ils soient physiques (*p. ex.*, neurostimulation électrique transcutanée, acupuncture) ou psychiques (*p. ex.*, relaxation, hypnose). Malgré l'émergence de ces nouvelles techniques, les médicaments représentent encore de nos jours la grande majorité des traitements antidouleur.

Dans le but de permettre une meilleure prescription et une meilleure utilisation des antalgiques, l'OMS (l'Organisation Mondiale de la Santé) a établi en 1986 une « échelle antalgique ». Les antalgiques sont répartis le long de cette échelle en trois paliers selon l'intensité graduelle de leurs effets. Les paliers 1 à 3 sont respectivement constitués : d'antalgiques non morphiniques prescrits dans le cas de douleurs faibles à modérées, d'opioïdes faibles pour traiter les douleurs modérées à intenses et d'opioïdes forts pour soulager les douleurs intenses à très intenses [**Figure 7**]. Outre les antalgiques classiques, il est possible d'utiliser des co-antalgiques. A l'origine, ces traitements sont utilisés pour des pathologies autres que le traitement de la douleur, mais ils sont aussi désormais utilisés pour leurs effets antalgiques.

a. Antalgiques

i. Palier 1 : antalgiques non morphiniques

On distingue deux grandes familles d'antalgiques non morphiniques : le paracétamol et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).

Le paracétamol

- Historique

Le paracétamol (ou acétaminophène), synthétisé en 1878 par Jarmon Northrop Morse, est l'antalgique le plus largement utilisé dans le monde (Brune et al., 2015). En 1893, Josef Von Mering met en évidence ses propriétés antalgique et antipyrétique.

Cependant, il mène des études de toxicité sur le paracétamol et la phénacétine (dont le paracétamol est un métabolite) et arrive à la conclusion erronée que, pour le rein, le paracétamol est plus toxique que son précurseur (Jackson et al., 1984). Ce résultat entraîne l'abandon de son utilisation jusqu'au début des années 1950. Il faut attendre 1948 pour que Bernard Brodie et Julius Axelrod démontrent non seulement que les effets antalgique et antipyrétique de l'acétanilide et de la phénacétine sont portés par leur métabolite commun : le paracétamol, mais aussi que ce dernier n'est pas responsable de la néphrotoxicité observée et qu'il ne présente pas les effets secondaires de ses deux précurseurs (Spooner et Harvey, 1976).

- Mécanismes d'action

Le paracétamol présente les mêmes effets antalgique et antipyrétique que les AINS mais, il ne possède pas d'action anti-inflammatoire significative (Anderson, 2008). Bien qu'il existe plusieurs hypothèses pour expliquer ses effets, il semble que son action soit essentiellement localisée au niveau du système nerveux central (Piletta et al., 1991 ; Bromm et al., 1992). Les différentes hypothèses sont les suivantes :

- Inhibition des COX-1, COX-2 et COX-3 (cyclo-oxygénases 1, 2 et 3) (Flower et Vane, 1972 ; Ouellet et Percival, 2001 ; Boutaud et al., 2002 ; Chandrasekharan et al., 2002). Toutefois la COX-3 ne semble pas être impliquée dans les processus de fièvre et de douleur chez l'homme (Kis et al., 2005). C'est chez le chien, que son rôle et son inhibition par le paracétamol ont été démontrés (Chandrasekharan et al., 2002).
- Inhibition des voies de synthèse du NO (oxyde nitrique) (Björkman et al., 1994, Bujalska, 2004).
- Activation des voies sérotoninergiques descendantes (Tjolsen et al., 1991 ; Pelissier et al., 1996 ; Pini et al., 1996 ; Pickering et al., 2008).
- Activation des récepteurs aux cannabinoïdes (Högestätt et al., 2005 ; Ottani et al., 2006 ; Mallet al, 2008).
- Inhibition des canaux calciques Cav3.2 (« calcium channel voltage-dependent ») via l'activation des canaux TRPV1 (« Transient Receptor Potential Vanilloid 1 ») au niveau supraspinal (Kerckhove et al., 2014)

A l'heure actuelle, aucune étude n'a permis de clairement mettre en évidence le mécanisme d'action du paracétamol. Ses effets résultent sans doute de la synergie de différents processus.

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

- Historique

Il existe de très nombreux AINS parmi lesquels nous pouvons citer les deux plus connus : l'acide acétylsalicylique (aspirine) et l'ibuprofène. Dès 400 av. J.C. Hippocrate parvient à traiter la fièvre et l'inflammation grâce à l'écorce de saule. Le principe actif de ce remède, l'acide salicylique, n'est isolé à partir de l'écorce de saule qu'en 1829 par un pharmacien français, Pierre-Joseph Leroux.

Son dérivé le plus courant, l'acide acétylsalicylique (aspirine) est synthétisé par Karl Friedrich Gerhard en 1852, mais il faut attendre 1897 pour que Felix Hoffmann découvre son potentiel antalgique. L'aspirine n'est introduite sur le marché qu'en 1899 par l'entreprise Bayer (Sabatowski et al., 2004 ; Rao et Knaus, 2008). Contrairement au paracétamol, l'aspirine possède de nombreux effets secondaires, notamment au niveau gastro-intestinal (Allison et al., 1992 ; Slater et al., 2010).

Les industries pharmaceutiques cherchent désormais à développer de nouveaux AINS présentant le moins d'effets secondaires possibles. En 1969, la compagnie Boots introduit sur le marché une nouvelle molécule, l'ibuprofène, qui semble être une bonne alternative à l'aspirine car bien que présentant des effets secondaires, ceux-ci sont atténués par rapport à ceux de l'aspirine. Ainsi, l'ibuprofène est aujourd'hui l'anti-inflammatoire le plus utilisé et le plus prescrit dans le monde (Bushra et Aslam, 2010).

- Mécanismes d'action

Le mécanisme d'action principal des AINS consiste à bloquer la production des prostaglandines, notamment en inhibant l'activité des COX-1 et COX-2 (Vane, 1971 ; Ferreira, 1972 ; Xie et al., 1992). L'inhibition des deux types de COX n'a pas la même incidence.

L'inhibition des COX-2 est responsable de l'effet anti-inflammatoire, alors que l'inhibition des COX-1 est à l'origine des effets secondaires indésirables des AINS (Vane et Botting, 1998). Dans le but de limiter au maximum ces effets secondaires, il est primordial de trouver des inhibiteurs sélectifs des COX-2.

Outre leurs effets anti-inflammatoires, les AINS possèdent des propriétés antalgiques qui seraient dues à des actions au niveau du système nerveux périphérique et du système nerveux central. Ainsi, au niveau du système nerveux périphérique, l'inhibition de la production des prostaglandines empêcherait la sensibilisation des nocicepteurs (Ferreira, 1972). Alors qu'au niveau du système nerveux central, les AINS semblent agir sur trois voies (sérotoninergique, opioïdergique et de l'oxyde nitrique) de manière séparée ou simultanée (Björkman, 1995).

ii. Palier 2 : antalgiques opioïdes faibles

Les antalgiques du palier 2 sont utilisés lorsque la douleur est trop importante pour être soulagée par les antalgiques non morphiniques. Les opioïdes exogènes miment les effets des opioïdes endogènes en se fixant sur leurs récepteurs (Slater et al., 2010). Les deux principaux opioïdes faibles utilisés de nos jours sont la codéine et le tramadol. Leur prescription est scrupuleusement encadrée car, comme tous les opioïdes, la codéine et le tramadol possèdent de nombreux effets secondaires indésirables, notamment au niveau digestif (*p. ex.*, constipation, nausées et vomissements) et neurologique (*p. ex.*, somnolence et vertiges). Ces deux molécules peuvent être administrées seules ou bien co-administrées avec du paracétamol ou des AINS permettant ainsi d'obtenir un effet synergique (Cooper et al., 1982 ; De Craen et al., 1996 ; Kolesnikov et al., 2003).

La codéine

- Historique

La codéine est un alcaloïde naturel découvert en 1832 par Pierre Jean Robiquet, un chimiste français. Elle a été isolée suite à l'extraction de la morphine à partir d'opium.

Pierre Jean Robiquet établit une collaboration avec le docteur Kunckel qui attribue à la codéine un effet sur la moelle épinière, mais qui se différencie de la morphine par l'absence de paralysie (Warolin, 1999).

- Mécanismes d'action

Les effets antalgiques de la codéine requièrent les récepteurs opioïdes MOP (μ) de manière directe ou indirecte. Il a été montré que la codéine pouvait agir directement en se fixant sur les récepteurs MOP (Chen et al., 1991 ; Caraco et al., 1996), ou qu'elle pouvait être d'abord métabolisée en morphine au niveau du foie suite à une déméthylation, pour ensuite agir sur ces mêmes récepteurs (Sindrup et al., 1990 ; Caraco et al., 1996).

Le tramadol

- Historique

Contrairement à la codéine, qui est d'origine naturelle, le tramadol est un composé synthétique. Il a été élaboré par l'entreprise allemande Grünenthal en 1962, mais n'a été commercialisé qu'à partir de 1977 en Allemagne (Leppert, 2009). C'est aujourd'hui l'opioïde faible le plus utilisé dans le monde. De manière surprenante, alors que le tramadol est un composé d'origine synthétique, en 2013, du tramadol d'origine naturelle a été retrouvé dans les racines du pêcher africain (*Nauclea latifolia*) (Boumendjel et al., 2013). Toutefois ces résultats font l'objet d'une controverse. Le tramadol est fortement utilisé par les populations locales, le composé retrouvé dans les racines pourrait résulter d'une contamination du sol par les urines et les excréments humains et bovins (Kusari et al., 2014 ; Boucherle et al., 2016).

- Mécanismes d'action

Le pouvoir antalgique du tramadol est dû à la combinaison de deux mécanismes bien distincts mais qui agissent conjointement. Il possède à la fois une activité opioïde-dépendante et une activité opioïde-indépendante (Raffa et al., 1992).

Son action opioïde-dépendante passe par les récepteurs MOP, mais avec une affinité pour ces récepteurs bien moindre que celle de la codéine (10 fois inférieure) ou de la morphine (6000 fois inférieure) (Raffa et al., 1992 ; Leppert, 2009). Le tramadol est également capable d'agir au niveau de la moelle épinière sur les systèmes sérotoninergique et noradrénergique, en inhibant la recapture de leurs deux médiateurs (Raffa et al., 1992). Outre son pouvoir antalgique, le tramadol possède aussi des propriétés anti-inflammatoires (Bianchi et al., 1999).

iii. Palier 3 : antalgiques opioïdes forts

Les opioïdes forts sont préconisés pour soulager les douleurs intenses voire très intenses, qu'elles soient aiguës, suite à une chirurgie ou un traumatisme par exemple, ou persistantes, notamment pour soulager des douleurs cancéreuses. D'après les recommandations de l'ANSM, il est préférable d'éviter ce type de traitement dans le cas des douleurs neuropathiques, la réaction provoquée étant imprévisible. L'opioïde fort de référence est la morphine, mais on peut également citer de façon non exhaustive parmi les plus utilisés trois autres opioïdes forts, que sont le fentanyl, l'hydromorphone et l'oxycodone. Ces 4 composés sont tous des puissants agonistes des récepteurs MOP.

La morphine

- Historique

La morphine, dont le nom provient du dieu des rêves Morphée, a été isolée à partir du pavot somnifère au début des années 1800 par Friedrich Wilhelm Sertürner (Hamilton et Baskett, 2000 ; Trescot et al., 2008). L'utilisation de la morphine se démocratise grandement à partir de 1853 grâce à l'invention de l'aiguille hypodermique par un physicien écossais, Alexander Wood. Elle permet l'administration de la morphine par voie intraveineuse (Hamilton et Baskett, 2000). Les récepteurs spécifiques aux opioïdes et notamment à la morphine ont été identifiés dans le système nerveux en 1973 par Candace Beebe Pert et Solomon Halbert Snyder (Pert et Snyder, 1973).

- Mécanismes d'action

L'effet antalgique de la morphine est dû à son action sur ses récepteurs présents à la fois dans le système nerveux périphérique et central. Les récepteurs aux opioïdes sont retrouvés tout au long des voies ascendantes et descendantes de transmission et de modulation de la douleur, y compris dans les neurones sensoriels, la moelle épinière, la substance grise périaqueducale, les noyaux du raphé, l'amygdale, l'hypothalamus et le cortex (Mansour et al., 1995 ; Fields, 2004).

A l'échelle cellulaire, la morphine agit au niveau pré-synaptique et post-synaptique. En se fixant sur son récepteur MOP couplé aux protéines G (Gi/o) en pré-synaptique, elle inhibe l'ouverture des canaux calciques dépendant du potentiel, empêchant une entrée de calcium et donc la libération des neurotransmetteurs pro-algiques. Du côté post-synaptique, l'activation des récepteurs favorise l'ouverture des canaux potassiques, entraînant une hyperpolarisation membranaire, inhibant ainsi la transmission du message nerveux. C'est la sommation de ces deux composantes qui induit une diminution du message nociceptif (Stein et al., 2003). Au niveau du système nerveux central, l'activation des récepteurs MOP produit une antalgie en inhibant les cellules « on » et en désinhibant les cellules « off » via les terminaisons inhibitrices GABAergiques.

A contrario, une activation des récepteurs KOP ou NOP favorise une hyperalgie (Fields, 2004). L'hyperalgie induite par la morphine est encore mal comprise, mais elle pourrait être due à différents mécanismes au niveau central (*i.e.*, système glutamatergique, facilitation des voies descendantes, etc.) (Lee et al., 2011). Les effets de la morphine peuvent être bloqués en utilisant la naloxone, un antagoniste des récepteurs opioïdes (Trescot et al., 2008).

Le fentanyl, l'hydromorphone et l'oxycodone

- Historique

Le fentanyl est un agoniste synthétique des récepteurs MOP synthétisé par Paul Janssen en Belgique en 1960.

Il est essentiellement utilisé par voie intraveineuse comme antalgique durant des actes chirurgicaux et en patch pour soulager des douleurs chroniques (Stanley, 2014).

Son pouvoir antalgique est 80 fois plus puissant que celui de la morphine (Trescot et al., 2008).

L'hydromorphone est un dérivé semi-synthétique de la morphine, développé en Allemagne en 1921. Cette molécule se lie principalement aux récepteurs MOP mais possède aussi une faible affinité pour les récepteurs DOP. Il possède les mêmes effets secondaires que la morphine mais avec un potentiel antalgique 5 fois supérieur à cette dernière (Murray et Hagen, 2005).

L'oxycodone est dérivé d'un alcaloïde de l'opium (la thébaïne) produit en Allemagne à partir de 1916. Il est capable de se lier aux trois types de récepteurs (*i.e.*, MOP, DOP et KOP) avec une bien meilleure affinité pour les récepteurs MOP. Sa puissance antalgique est 2 à 4 fois supérieure à celle de la morphine, mais il possède des effets hallucinogènes assez importants (Kalso, 2005).

Ces trois molécules sont principalement indiquées pour soulager les douleurs cancéreuses.

- Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action de ces 3 molécules est similaire à celui de la morphine. Cependant, il existe des différences qui résultent de la pharmacocinétique et des voies d'administration possibles pour ces différents opioïdes.

De nos jours, le panel de molécules permettant de soulager la douleur ne se limite pas aux antalgiques classiques, qu'ils soient ou non morphiniques. En effet, des médicaments dont la fonction première était le traitement de diverses pathologies sont désormais prescrits pour leurs propriétés antalgiques.

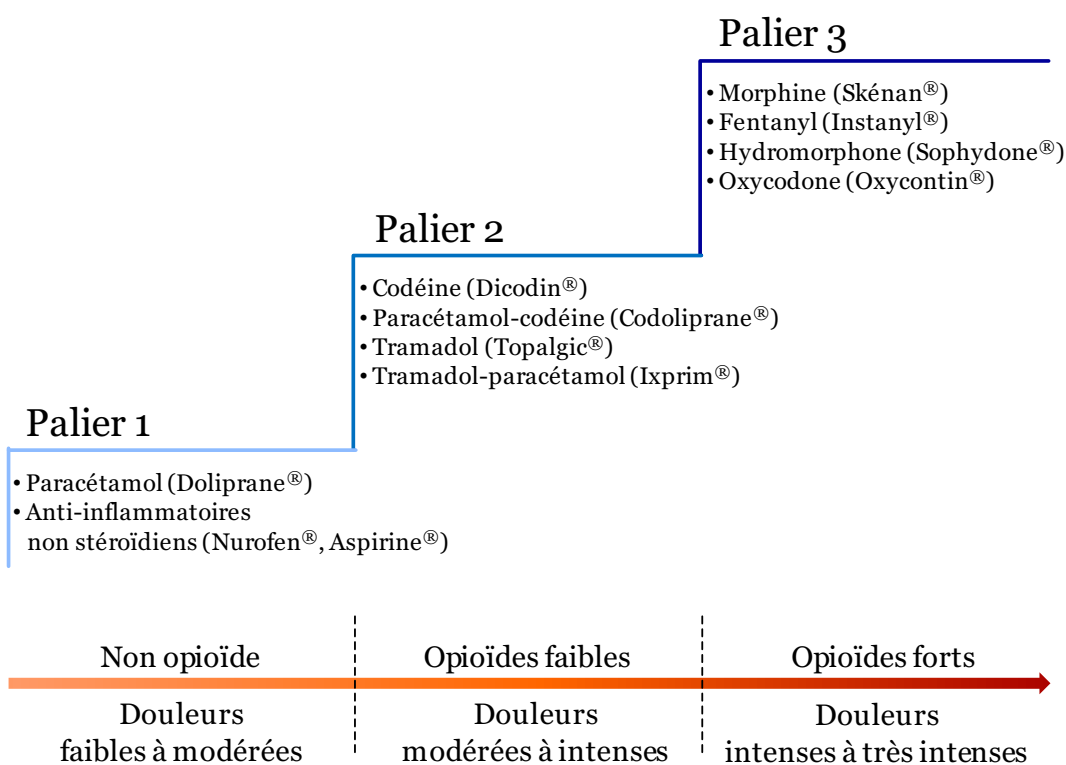


Figure 7 : Échelle des antalgiques d'après l'OMS.

Les antalgiques sont répartis le long de trois paliers en fonction de l'intensité des douleurs qu'ils peuvent soulager.

b. Co-antalgiques

Il existe de très nombreux médicaments qui peuvent être utilisés comme co-antalgiques ou « médicaments adjuvants », parmi lesquels on peut citer de façon non exhaustive, les antidépresseurs, les antiépileptiques et les corticoïdes (Libert et al., 2006).

Les antidépresseurs

Plusieurs études ont démontré que les antidépresseurs (*p. ex.*, l'imipramine) pouvaient avoir un rôle antalgique aussi bien sur des modèles animaux (Tura et Tura, 1990 ; Ardid et Guilbaud, 1992) que chez des patients (Max et al., 1987 ; Poulsen et al., 1995). Les antidépresseurs jouent un rôle à la fois sur la composante psychique de la douleur, lorsque la dépression accompagne les douleurs chroniques et sur la physiologie de la perception douloureuse (Libert et al., 2006).

D'un point de vue physiologique, il a été démontré que les antidépresseurs agissent au niveau du système nerveux central et périphérique. Leur pouvoir antalgique s'exerce grâce à différents mécanismes que sont : l'inhibition de la recapture de la noradrénaline et de la sérotonine, l'inhibition de divers récepteurs (*p. ex.*, NMDA, nicotinique et histaminergique) ou encore l'activation des récepteurs à l'adénosine et le blocage de divers canaux ioniques (calciques, potassiques et sodiques) (Sawynok et al., 2001 ; Libert et al., 2006 ; Mico et al., 2006).

Les antiépileptiques

Les antiépileptiques (*p. ex.*, la carbamazépine) sont utilisés essentiellement contre les douleurs neuropathiques depuis le début des années 1960 (Wiffen et al., 2013). Les différents antiépileptiques du marché ayant un effet antalgique agissent sur diverses cibles, en jouant sur la balance excitation/inhibition (Libert et al., 2006). Ils sont capables de moduler les transmissions glutamatergiques et GABAergiques et de bloquer les canaux calciques et sodiques dépendants du potentiel (Libert et al., 2006 ; Dickenson et Ghandehari, 2007 ; Wiffen et al., 2013). Les antiépileptiques, comme la plupart des antalgiques ne sont pas dépourvus d'effets secondaires, parmi lesquels on retrouve couramment les vertiges et les nausées (Maizels et Mccarberg, 2005).

Les corticostéroïdes

Les corticostéroïdes (*p. ex.*, la dexaméthasone) possèdent des rôles antalgique et anti-inflammatoire (Leppert et Buss, 2012). Ils sont notamment prescrits dans le cas de douleurs cancéreuses et lors de compression de la moelle épinière pour soulager des œdèmes (Cleary, 2014). Leurs propriétés antidouleur et anti-inflammatoire seraient dues à une inhibition de la production des prostaglandines, une altération de l'expression de neuropeptides impliqués dans la transmission douloureuse au niveau de la moelle épinière, une diminution de la perméabilité vasculaire et une diminution de l'excitabilité neuronale (Devor et al., 1985 ; Libert et al., 2006 ; Pinto-Ribeiro et al., 2009).

Afin d'éviter au maximum leurs effets secondaires, principalement la prise de poids et les insomnies, il est préférable de prendre le traitement sur une courte durée, ne dépassant pas trois semaines (Vyvey, 2010).

La pharmacologie actuelle de la douleur est constituée d'un large éventail de molécules permettant de soulager des douleurs faibles à très intenses en agissant sur diverses cibles et via différents mécanismes. Cependant ces traitements présentent encore de trop nombreux effets secondaires indésirables et beaucoup de douleurs, notamment chroniques (*p. ex.*, douleurs cancéreuses, zona, fibromyalgies) restent encore mal soulagées par l'arsenal thérapeutique actuel.

C'est pour cela que la recherche doit être axée sur le développement de nouvelles molécules thérapeutiques au pouvoir antalgique avéré, mais dont les effets secondaires seront limités voire inexistantes. Il est donc important de centrer les recherches sur les voies et les acteurs moléculaires de la douleur, afin de mieux connaître ces cibles d'intérêts.

3. Anatomophysiologie des voies sensorielles et nociceptives périphériques

La somesthésie est définie comme le « domaine de la sensibilité qui concerne la perception consciente de toutes les modifications intéressant le revêtement cutanéomuqueux, les viscères, le système musculaire et ostéo-articulaire » (Larousse).

En d'autres termes, c'est donc l'ensemble des sensations provenant du corps, à l'exception des perceptions auditives, gustatives, olfactives et visuelles. Pour toutes les modalités somesthésiques, les voies dédiées ont une architecture semblable. En effet, l'information est perçue à la périphérie grâce à des récepteurs spécialisés, le message est ensuite propagé sous forme d'influx nerveux grâce à des fibres sensorielles jusqu'à la moelle épinière (ou jusqu'au tronc cérébral pour les nerfs crâniens), puis il remonte jusqu'à l'encéphale pour y être intégré et interpréter.

La somesthésie regroupe les sensibilités proprioceptive, extéroceptive et nociceptive, qui impliquent des récepteurs spécifiques.

La proprioception renseigne sur la position et les mouvements du corps et des membres via des mécanorécepteurs situés au niveau articulaire, musculaire et tendineux.

La sensibilité extéroceptive mobilise les récepteurs cutanés du toucher (mécanorécepteurs) qui permettent de ressentir toutes les modalités tactiles (*p. ex.*, effleurement, étirement, pression, vibration) et les récepteurs thermiques (thermorécepteurs) pour la perception du frais, du tiède, du froid et du chaud non nocifs.

La nociception met en jeu des récepteurs (nocicepteurs) qui sont capables de détecter des stimuli potentiellement nocifs quelle que soit leur nature (mécanique, thermique ou chimique) (Gardner et Johnson, 2013).

a. Fibres sensorielles et nociceptives

Les nerfs spinaux et crâniens sont des nerfs mixtes, composés à la fois de fibres afférentes sensibles et efférentes motrices. Les fibres afférentes projettent vers la corne dorsale de la moelle épinière via sa racine dorsale, alors que les fibres efférentes, en provenance de la corne ventrale de la moelle épinière via sa racine ventrale, innervent les muscles.

Dans la suite de ce chapitre, je ne m'intéresserai qu'à la composante sensitive du système nerveux périphérique.

Pour un territoire cutané (dermatome), musculaire (myotome), articulaire (sclérotome) ou viscéral (viscérotome) donné, l'ensemble des fibres afférentes primaires qui innervent ce territoire sont regroupées dans une gaine pour former un nerf spinal (ou un nerf crânien) (Gardner et Johnson, 2013). Chez l'homme, on dénombre 31 paires de nerfs spinaux (34 chez les rongeurs) qui sont répartis de la manière suivante :

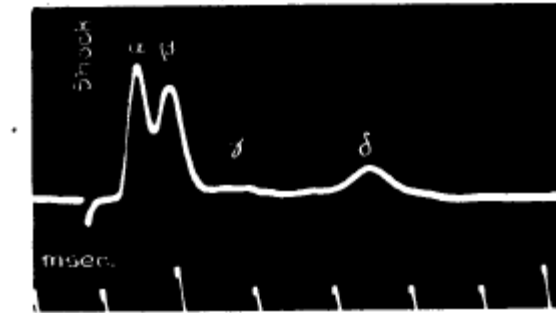
- 8 nerfs cervicaux.
- 12 nerfs thoraciques (13 pour les rongeurs).
- 5 nerfs lombaires (6 pour les rongeurs).
- 5 nerfs sacrés (4 pour les rongeurs).
- 1 nerf coccygien (3 pour les rongeurs) (Sidman et al., 1971 ; Yoshida et al., 2013).

i. Classification des fibres afférentes

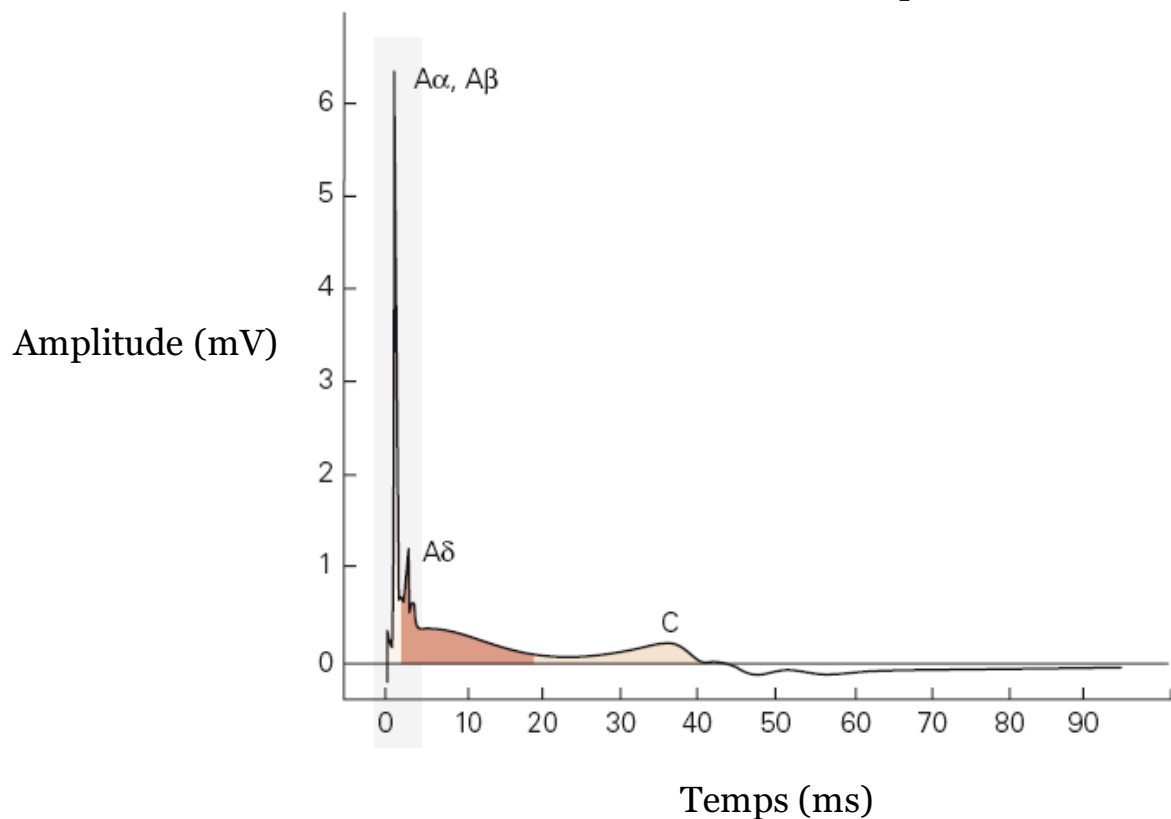
Les fibres nerveuses afférentes ne sont pas toutes identiques et peuvent être différenciées selon plusieurs critères. Chaque type de fibre possède : un diamètre, une épaisseur de gaine de myéline autour de l'axone, une vitesse de conduction et un seuil d'activation qui lui est propre. De plus, on peut aujourd'hui utiliser différents marqueurs moléculaires pour différencier ces fibres.

Dans les années 1940, deux classifications ont été proposées. La classification d'Erlanger et Gasser utilise des lettres latines modernes et grecques, alors que celle de Lloyd et Hunt utilise des chiffres romains. De nos jours, la classification d'Erlanger et Gasser, qui répertorie les fibres selon leur vitesse de conduction, est la plus communément utilisée, notamment pour les fibres cutanées. Tandis que celle de Lloyd et Hunt, qui hiérarchise les fibres selon leur diamètre, est utilisée pour les fibres innervant les muscles. Cependant, il est possible de faire un parallèle entre ces deux classifications, car la vélocité et le diamètre des fibres sont étroitement liés. Plus le diamètre d'une fibre est important, plus la vitesse de conduction de celle-ci est élevée.

En 1924, suite à la stimulation périphérique d'un nerf isolé, Joseph Erlanger, Herbert Gasser et George Bishop enregistrent grâce à un oscilloscope des « pics de voltage », qu'ils nomment : α , β , γ et δ selon leur ordre séquentiel d'apparition [**Figure 8A**]. En 1941, suite à de nouveaux enregistrements avec des équipements qui ont une meilleure sensibilité, Erlanger et Gasser propose une classification qui a depuis été encore affinée pour aboutir, chez les mammifères, à la classification actuelle : $A\alpha$, $A\beta$, $A\gamma$, $A\delta$, B et C [**Figure 8B**].

A**B**

Potentiel d'action composé

**Figure 8 : Classification des fibres afférentes.**

A. Enregistrement original d'un PA (potentiel d'action) suite à la stimulation du nerf saphène chez le lapin (Gasser, 1941).

B. Schéma de la décomposition d'un potentiel d'action de mammifère. Représentation de l'amplitude de la réponse des différentes fibres afférentes en fonction du temps. De part leur diamètre, les fibres A ont une vitesse de conduction plus rapide et donc un temps de latence plus court que les fibres C. (D'après Basbaum et Jessell, 2013)

Les fibres A β et A δ sont uniquement afférentes (sensitives), les fibres A α et C peuvent être afférentes ou efférentes, alors que les fibres A γ et B sont des fibres efférentes et donc par conséquent non sensibles (Gasser, 1941 ; Manzano et al., 2008 ; Gardner et Johnson, 2013). Ainsi, les fibres A γ (motoneurones γ) et une partie des fibres A α (motoneurones α) ont un rôle moteur. Elles proviennent de la corne ventrale de la moelle épinière et permettent toutes les deux la contraction musculaire (Pearson et Gordon, 2013). Les fibres B et une partie des fibres C sont respectivement des fibres pré et post-ganglionnaires du système nerveux autonomes (Manzano et al., 2008).

Les fibres A α (ou fibres I) sont des fibres très fortement myélinisées de gros diamètre (12 à 20 μm) avec la vitesse de conduction la plus élevée de toutes les fibres sensorielles (70 à 120 m.s^{-1}).

Les fibres A β sont des fibres fortement myélinisées, de moyen diamètre (6 à 12 μm) avec une vitesse de conduction inférieure aux A α (16 à 100 m.s^{-1}).

Les fibres A δ ne sont que faiblement myélinisées, elles ont un faible diamètre (1 à 6 μm) et une faible vitesse de conduction (4 à 30 m.s^{-1}).

Les fibres C, contrairement aux fibres A, sont non myélinisées. Ce sont les fibres avec le diamètre le plus petit (0,2 à 1,5 μm) et la plus faible vitesse de conduction (0,2 à 2 m.s^{-1}) [**Figure 9 et Tableau 1**].

Si on se réfère à la classification de Lloyd et Hunt établie en 1943, les fibres A α , A β , A δ et C d'Erlanger et Gasser correspondent respectivement aux fibres I, II, III et IV. Toutefois, pour David Lloyd et Carlton Hunt il faut différencier : les fibres Ia (fuseaux neuromusculaires) qui innervent le muscle à proprement parlé et les fibres Ib (organes tendineux de Golgi) qui innervent les tendons (Lallemend et Ernfors, 2012 ; Abaira et Ginty, 2013 ; Gardner et Johnson, 2013).

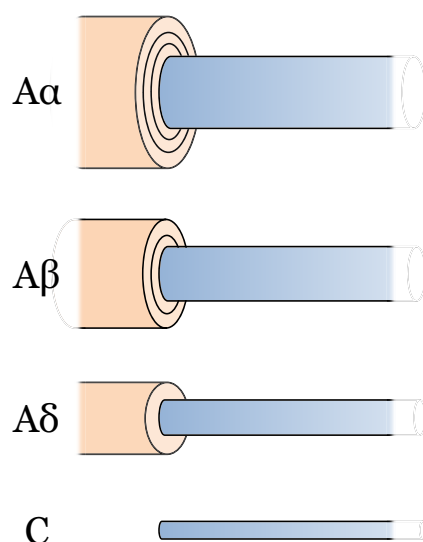


Figure 9 : Fibres nerveuses sensibles afférentes

Représentation schématique de la taille des différentes fibres sensibles et de l'épaisseur de leur gaine de myéline. (D'après Gardner et Johnson, 2013).

Fibres	Présence de myéline	Vitesse de conduction (m.s ⁻¹)	Diamètre de l'axone (µm)	Rôles somesthésiques
Aα (I)	Oui (+++)	70 - 120	12 - 20	Proprioception (musculaire et tendineuse)
Aβ (II)	Oui (++)	16 - 100	6 - 12	Proprioception (musculaire et articulaire) Mécanoperception (cutanée)
Aδ (III)	Oui (+)	4 - 30	1 - 6	Mécanoperception (cutanée et musculaire) Thermoperception (non nocive) Nociception (mécanique, thermique et chimique)
C (IV)	Non	0,2 - 2	0,2 - 1,5	Mécanoperception (cutanée) Thermoperception (non nocive) Nociception (mécanique, thermique et chimique)

Tableau 1 : Classification et implications des fibres sensibles afférentes.

ii. Fibres A α et A β

Les fibres A α sont impliquées dans la proprioception au niveau musculaire et tendineux. Au niveau musculaire, les fuseaux neuromusculaires primaires (fibres Ia) sont des fibres musculaires autour desquelles s'enroule une terminaison nerveuse. Ce sont des senseurs des phases dynamiques de l'étirement et du raccourcissement du muscle. A la jonction entre le muscle et le tendon, les organes tendineux de Golgi (fibres Ib) permettent eux de ressentir l'état de contraction du muscle (Gardner et Johnson, 2013 ; Pearson et Gordon, 2013).

Les fibres A β sont impliquées non seulement dans la proprioception au niveau musculaire et articulaire, mais aussi dans la mécanoperception au niveau cutané. Au niveau musculaire, ces fibres constituent le fuseau neuromusculaire secondaire (fibres II). Contrairement aux fibres I, les fibres II sont des senseurs des phases statiques de la contraction musculaire (Lallemend et Ernfors, 2012 ; Abaira et Ginty, 2013 ; Gardner et Johnson, 2013). Au niveau articulaire, on retrouve trois types de récepteurs encapsulés que sont : les corpuscules de Pacini, les corpuscules de Ruffini et les organes tendineux de Golgi. Ils fournissent des informations sur l'angle des articulations aussi bien au repos que durant un mouvement (Newton, 1982).

En plus de leur rôle dans la proprioception, les fibres A β sont les fibres responsables de la mécanoperception non nocive au niveau de la peau glabre. Elles peuvent être sous-divisées en quatre sous-types selon leur sensibilité et les propriétés de leur récepteur. Les fibres à adaptation rapide RA (« rapidly adapting ») répondent lorsque l'intensité du stimulus varie, alors que les fibres à adaptation lente SA (« slowly adapting ») ne répondent que lors des phases stationnaires. Les fibres RA et SA sont soit de type 1 si leurs récepteurs sont petits et situés entre l'épiderme et le derme, soit de type 2 si leurs récepteurs sont plus volumineux et retrouvés plus en profondeur. Les noms des différents récepteurs présents à l'extrémité de ces fibres, ainsi que leurs fonctions sont résumés dans le **tableau 2** (Delmas et al., 2011 ; Abaira et Ginty, 2013 ; Gardner et Johnson, 2013 ; Pearson et Gordon, 2013).

Au niveau de la peau poilue, les fibres A β innervent également le duvet (23% des poils) et les poils de garde (1% des poils). Elles permettent de ressentir les mouvements fins et légers des poils, ainsi que la présence d'objets étrangers sur notre peau (Löken et al., 2009 ; Li et al., 2011 ; Abraira et Ginty, 2013 ; Lechner et Lewin, 2013).

Les fibres SA peuvent s'activer lors d'un refroidissement dans la gamme de température fraîche (Hensel et Zottermann, 1951 ; Cahusac et Noyce, 2007 ; Li et al., 2011), mais leur fréquence de décharge semble toutefois négligeable en comparaison de leur activité lorsqu'elles sont activées par un stimulus mécanique (Schepers et Ringkamp, 2009).


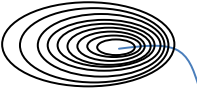




Nom du récepteur	Fibres	Schéma du récepteur	Localisation	Localisation
Corpuscule de Meissner	A β (RA1)		Derme papillaire	Mouvements horizontaux de la peau ; Détection des objets
Corpuscule de Pacini	A β (RA2)		Derme	Vibration ; Préhension des objets
Cellules de Merkel	A β (SA1)		Epiderme	Pression ; Texture et forme des objets
Corpuscule de Ruffini	A β (SA2)		Derme	Etirement ; Informations spatiales
Terminaison libre	C		Epiderme	Toucher agréable
Terminaison longitudinale lancéolée	A β /A δ /C		Follicule pileux	Mouvements des poils, Détection des objets

Tableau 2 : Classification et rôles des mécanorécepteurs.

iii. Fibres A δ et C

Les fibres A δ et C peuvent être à bas seuil ou à haut seuil. Généralement, les fibres dites à bas seuil sont impliquées dans les perceptions sensorielles, alors que les fibres dites à haut seuil sont impliquées dans les perceptions nocives (Lumpkin et Caterina, 2007 ; Delmas et al., 2011 ; Abraira et Ginty, 2013).

Les fibres A δ participent aux perceptions mécaniques, thermiques et chimiques qu'elles soient nocives ou non.

Au niveau de la peau poilue, les fibres A δ sont présentes au niveau des poils en « zigzag » (76% des poils) et du duvet. Elles ont le même rôle que les fibres A β (Löken et al., 2009 ; Li et al., 2011 ; Abraira et Ginty, 2013 ; Lechner et Lewin, 2013).

Comme les fibres A δ , les fibres C jouent un rôle dans les perceptions mécaniques, thermiques et chimiques, principalement nocives.

Elles participent à la perception mécanique non nocive au niveau de la peau poilue où elles sont impliquées dans le plaisir procuré par le toucher agréable lors d'interactions entre individus (Löken et al., 2009 ; Li et al., 2011 ; Abraira et Ginty, 2013 ; Lechner et Lewin, 2013). Ces fibres peuvent également s'activer lors d'un refroidissement à condition que celui-ci soit supérieur à 2°C.s⁻¹ (Hensel et Zottermann, 1951 ; Cahusac et Noyce, 2007 ; Li et al., 2011).

La thermoperception du froid non nocif ou frais met en jeu les fibres A δ et C, qui sont alors nommées « fibres-froides ». A contrario, la perception du chaud non nocif ou tiède n'implique que des fibres C, nommées « fibres-chaudes » (Maruhashi et al., 1952 ; Douglas et al., 1960 ; Hensel et al., 1960 ; Hensel et Iggo, 1971 ; Dubner et al., 1975 ; Mackenzie et al., 1975 ; Darian-Smith et al., 1979).

Les fibres-froides sont déjà actives à la température cutanée et ont une activité en forme de cloche qui atteint son maximum pour des températures comprises entre 20 et 30°C (Hensel, 1951 ; Darian-Smith et al., 1973 ; Dubner et al., 1975 ; Kenshalo et Duclaux, 1977 ; Schepers et Ringkamp, 2009). Leur fréquence de décharge augmente lors d'un refroidissement et diminue jusqu'à devenir silencieuse lors d'un réchauffement (Campero et al., 2001). Les fibres froides peuvent être à bas seuil (uniquement des fibres C) ou à haut seuil (fibres A δ et C). Les fibres à bas seuil ont

une activité maximale entre 30 et 25°C, alors que les fibres à haut seuil s'activent en dessous de 27°C, mais elles s'arrêtent très rapidement de décharger des PA lorsque la température se stabilise (Lamotte et Thalhammer, 1982 ; Thut et al., 2003 ; Schepers et Ringkamp, 2009).

Les fibres-chaudes ont un fonctionnement similaire à celui des fibres-froides, puisque leur réponse est en forme de cloche entre 30 et 44°C avec un maximum à 41°C (Hensel et Iggo, 1971). Contrairement aux fibres-froides, les fibres-chaudes sont exclusivement de type C (Konietzny et Hensel, 1975 ; Mackenzie et al., 1975 ; Lamotte et Campbell, 1978 ; Darian-Smith et al., 1979).

b. Nociception et nocicepteurs

La nociception a été nommée pour la première fois en 1906 par Sherrington. Elle est aujourd'hui définie par l'IASP comme le processus neuronal permettant le codage et le traitement des stimuli générateurs de douleur.

Une perception est considérée comme nociceptive lorsque l'intensité de la stimulation appliquée atteint un seuil suffisamment élevé pour (i) être potentiellement dommageable et (ii) engendrer l'activation de neurones périphériques spécialisés de petit et moyen diamètres, les nocicepteurs (Dubin et Patapoutian, 2010).

Les nocicepteurs s'activent préférentiellement en réponse à des stimuli nocifs et déchargent des potentiels d'actions de manière graduelle. Ils reflètent ainsi l'intensité de la stimulation appliquée (Julius et Basbaum, 2001). Toutefois ils peuvent également avoir un seuil d'activation dans une large gamme allant d'intensités non-nocive à nocive. Dans ce dernier cas, c'est toujours pour des intensités élevées (nocives) que la réponse est la plus intense (Dubin et Patapoutian, 2010). Les nocicepteurs ne sont pas les seuls neurones impliqués dans la transmission du message nociceptif, en effet certains neurones dits à bas seuil sont également capables de répondre dans des gammes d'intensité nocives, notamment au niveau viscéral (Cervero et Jänig, 1992).

Quelle que soit la nature de la stimulation, qu'elle soit mécanique, thermique ou chimique, la nociception est majoritairement due à l'activation des fibres A δ et C. Ces fibres n'ayant pas la même vitesse de conduction, les douleurs peuvent être hiérarchisées. Ainsi, on parle de première douleur ou douleur rapide lors d'une activation des fibres A δ et de deuxième douleur ou douleur lente lors d'une activation des fibres C (Price et Dubner, 1977 ; Basbaum et al., 2009).

Les nocicepteurs peuvent être classés selon différents critères, tels que la vitesse de conduction de l'influx nerveux, la nature de la stimulation, les caractéristiques de la réponse engendrée ou encore des marqueurs moléculaires neuronaux (Meyer et al., 2006).

En ne s'intéressant qu'à la nature de la stimulation, les nocicepteurs peuvent être différenciés selon leur sensibilité ou insensibilité aux stimuli mécaniques, thermiques et chimiques. Dans la plupart des études, la classification est uniquement établie en fonction des réponses aux stimuli mécaniques et thermiques chauds. Ceci s'explique, premièrement, par le fait que la sensibilité au froid n'est que rarement testée sur les fibres nociceptives, ce qui exclu les fibres froides de la plupart des classifications et deuxièmement, qu'il n'existe pas de nocicepteurs uniquement chémosensibles.

En effet, la plupart des chémorécepteurs sont des nocicepteurs mécano-thermosensibles et inversement la quasi totalité des nocicepteurs mécano-thermosensibles sont aussi chémosensibles (Davis et al., 1993).

Les nocicepteurs, sensibles à la fois aux stimuli mécaniques, thermiques chauds et chimiques, sont majoritaires. Ils ont été caractérisés pour la première fois sur des fibres C en 1969 et sont appelés nocicepteurs polymodaux [**Figure 10**] (Bessou et Perl, 1969 ; Perl, 1996).

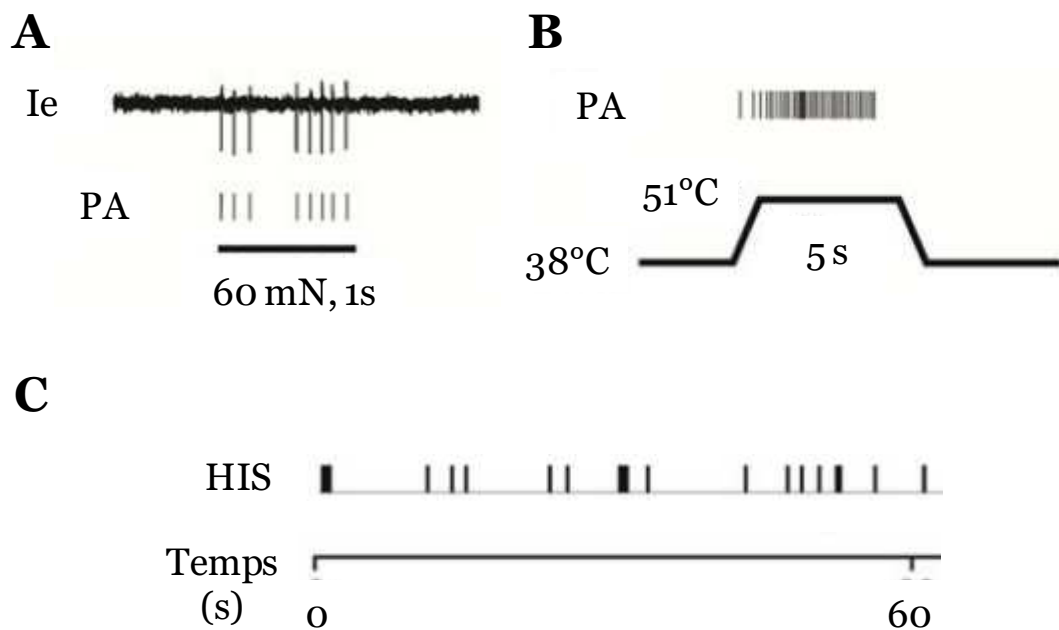


Figure 10 : Nocicepteur polymodal.

Enregistrements électrophysiologiques *in vivo* d'un nocicepteur polymodal de souris.

A. Réponse mécanique du neurone suite à l'application d'une force de 60 mN au niveau de la cheville.

B. Réponse thermique du neurone suite à l'application d'une rampe de température de 38 à 51°C.

C. Réponse chimique du neurone après l'injection intra-dermale d'histamine (5.4 mM).

Abréviation : Ie : courant extracellulaire ; PA : potentiel d'action ; HIS : histamine

(D'après Han et al., 2013).

i. Nocicepteurs cutanés

Des études menées chez la souris, le singe et l'homme ont permis la mise en évidence de plusieurs sous-types de nocicepteurs. Bien que des divergences apparaissent dans les différentes publications, du fait que toutes les modalités ne sont pas toujours testées, on peut dénombrer un total de treize nocicepteurs. Les nocicepteurs peuvent être classés dans cinq catégories différentes selon leur sensibilité/insensibilité mécanique et/ou thermique. Ainsi on trouve des nocicepteurs : mécanosensibles, thermosensibles, mécano-thermosensibles au froid, mécano-thermosensibles au chaud (*i.e.*, polymodaux) et mécano-thermo-insensibles (*i.e.*, silencieux).

Comme pour les perceptions non nocives évoquées précédemment, les nocicepteurs mécanosensibles sont constitués de fibres A δ et C, alors que les nocicepteurs spécifiquement thermosensibles sont uniquement formés de fibres de type C. Les nocicepteurs sensibles au chaud et au froid ont des seuils d'activation respectifs de 40°C et de 32°C. Mais paradoxalement, les nocicepteurs sensibles au froid peuvent décharger des PA lors d'un réchauffement avoisinant les 48°C (Cain et al., 2001 ; Meyer et al., 2006 ; Zimmermann et al., 2009 ; Dubin et Patapoutian, 2010).

Les fibres activées par une stimulation mécanique et par le froid nocif, voire brûlant ont des seuils d'activation thermique très variable allant de 28 à -12°C, avec une moyenne à 5.3°C pour les fibres de type A et à 10.1°C pour les fibres de type C (Cain et al., 2001). Comme pour les fibres uniquement thermosensibles, ces fibres ont une activité paradoxale pour des températures comprises entre 45 et 50°C (Zimmermann et al., 2009).

Les nocicepteurs mécano-thermosensibles au chaud ou polymodaux sont constitués de fibres A δ et C.

Les fibres de type A mécano-thermosensibles au chaud peuvent appartenir à deux groupes. Les fibres du groupe I ont un seuil mécanique faible (entre 3.7 et 5 bar) et un seuil thermique élevé (>53°C), alors que les fibres du groupe II ont un seuil mécanique élevé (entre 11 et 15 bar) et un seuil thermique bas (46°C). Les fibres de type I et II participent respectivement à la transmission des douleurs lente et rapide (Treede et al., 1995).

Précédemment j'ai évoqué le fait que la nociception était principalement permise grâce aux fibres A δ et C. Néanmoins, l'étude des fibres mécano-thermosensibles de type I a permis de mettre en évidence une vitesse de conduction comprise entre 25 et 55 m.s⁻¹, suggérant un mélange de fibres A β et A δ , ce qui est surprenant compte tenu que les fibres A β ne sont normalement pas nociceptives (Djoughri et Lawson, 2004). Les fibres C mécano-thermosensibles au chaud ont un seuil thermique plus bas que les fibres A (entre 39 et 41°C) (Tillman et al., 1995).

Les nocicepteurs sensibles aux stimuli mécaniques, thermiques chauds et froids, peuvent être classés dans la catégorie précédente si le froid n'a pas été testé sur ces fibres. Ces nocicepteurs sensibles à toutes les natures de stimulations représentent respectivement 5 à 15% et 60 à 70% des fibres A δ et C nociceptives (Simone et Kajander, 1997 ; Cain et al., 2001). Ces données font des fibres C polymodales les fibres C nociceptives les plus répandues.

Enfin, les nocicepteurs mécano-thermo-insensibles nommés nocicepteurs silencieux ne sont pas réellement mécano-thermo-insensibles. En effet, ces nocicepteurs peuvent soit être activés par des stimulation mécaniques extrêmes, soit être mécano-ou thermosensibles lorsqu'ils sont sensibilisés par des agents chimiques irritants (Schmidt et al., 1995 ; Meyer et al., 2006).

ii. Nocicepteurs articulaires

A l'échelle articulaire, la nociception est seulement étudiée en utilisant des stimuli mécaniques et chimiques. Pour les tissus profonds, une stimulation thermique n'a pas d'intérêt car elle serait artificielle et non physiologique. Des rotations internes et externes selon différents angles, ainsi que des extensions de genoux de chats et de rats ont permis de montrer l'implication des fibres des groupes II, III et IV (équivalent des fibres A β , A δ et C) dans le processus nociceptif (Raja et al., 1988 ; Schaible et Grubb, 1993 ; Messlinger et al., 1996).

Les trois groupes de fibres peuvent être subdivisés en fonction de leur réponse aux mouvements indolores et douloureux :

Les fibres du groupe II (A β) peuvent être sensibles aux mouvements : uniquement indolores (32% des fibres), uniquement douloureux (14%) ou les deux (54%).

Les fibres du groupe III (A δ) sont sensibles aux mouvements : uniquement indolores (12%), uniquement douloureux (30,5%) ou les deux (33,5%).

Les fibres du groupe IV (C) répondent aux mouvements : uniquement indolores (19,5%), uniquement douloureux (34%) ou les deux (10%).

Toutefois, une partie non négligeable des fibres des groupes III (24%) et IV (36.5%), ne sont pas sensibles aux mouvements.

Chez ces mêmes animaux, il a été montré que près de 80% des fibres articulaires afférentes pouvaient être considérées comme nociceptives (Langford, 1983 ; Hildebrand et al., 1991 ; McDougall, 2006).

iii. Nocicepteurs viscéraux

Contrairement aux douleurs cutanée et articulaire qui sont très correctement localisées, la douleur viscérale est plus diffuse et donc par conséquent moins précisément localisable. Ceci s'explique d'une part par le fait que les terminaisons nerveuses viscérales sont plus éparses et d'autre part par le fait qu'au niveau de la moelle épinière, les neurones de second ordre qui reçoivent les informations viscérales, reçoivent également des innervations cutanées et articulaires. Ainsi, par exemple, la douleur éprouvée lors d'une angine de poitrine est ressentie dans le bras et l'épaule gauche, car les neurones de second ordre percevant les informations du cœur, font également connexion avec les nocicepteurs provenant de l'épaule et du bras. A contrario, une douleur cutanée au niveau de la poitrine est précisément localisable (Robinson et Gebhart, 2008).

En raison des contraintes techniques liées à l'accessibilité des viscères, la majorité des études ne s'intéresse qu'à la nociception mécanique et/ou chimique (Gebhart, 1996). Néanmoins, des études menées sur les afférences testiculaires du chien (Kumazawa et Mizumura, 1977), cardiaques et vésicales du chat (Baker et al., 1980 ; Häbler et al., 1990), biliaires du furet (Cervero, 1982), utérines du rat (Berkley et al., 1988), urétérales du cochon d'Inde (Cervero et Sann, 1989) et œsophagiques de l'opossum (Sengupta et al., 1990 ; Sengupta et al., 1992) ont permis d'étudier les sensibilités mécaniques, thermiques et chimiques des fibres nociceptives viscérales de type A δ et C. Il a par exemple été montré qu'au niveau testiculaire, à l'exception de quelques fibres C (6% des fibres), la quasi-totalité des fibres sont de type A δ . La majorité (90%) des fibres mécanosensibles testées répondent aussi aux stimuli thermiques chauds et chimiques nocifs et non nocifs. L'ensemble des résultats obtenus suggère que la plupart des nocicepteurs viscéraux sont des récepteurs polymodaux (Kumazawa et Mizumura, 1977 ; Kumazawa et Mizumura, 1980a, Kumazawa et Mizumura, 1980b ; Cervero et Jänig, 1992 ; Gebhart, 1996).

En conclusion, au niveau cutané, articulaire et viscéral, il existe un large panel de nocicepteurs qui sont majoritairement polymodaux. De plus, certains récepteurs à bas seuil sont aussi capables de décharger des PA pour des stimulations de haute intensité, ce qui élargit d'autant plus le panel des récepteurs permettant de percevoir des stimuli potentiellement nocifs.

iv. Modulateurs biochimiques inflammatoires nociceptifs

Dans les paragraphes précédents, j'ai évoqué la nociception due à l'application de stimuli nocifs principalement exogènes, mais les nocicepteurs peuvent être activés ou sensibilisés suite à une pathologie (*p. ex.*, ischémie, tumeur) ou un dommage tissulaire créant une inflammation.

Lors d'une inflammation, les terminaisons sensorielles et les cellules non neuronales résidentes ou circulantes vont alors libérer et/ou sécréter un ensemble de médiateurs chimiques regroupés sous le terme de « soupe inflammatoire ». Les cellules lésées vont libérer, entre autres, deux composés que sont l'ATP (adénosine triphosphate), également libéré par les plaquettes et les protons qui vont se fixer sur des canaux ioniques.

La dégradation des membranes cellulaires va également entraîner la libération de lipides. Les autres médiateurs inflammatoires tels que la bradykinine, des amines (sérotonine et histamine), des cytokines (principalement l'interleukine-1 β et le TNF- α ou facteur de nécrose tumorale α), des neurotrophines, principalement le facteur de croissance des nerfs (NGF) et de l'oxyde nitrique sont majoritairement sécrétés par les macrophages, les mastocytes et les plaquettes.

Contrairement aux protons et à l'ATP qui activent les nocicepteurs (effet direct), ces molécules se lient à des récepteurs métabotropiques sensibilisant ainsi les nocicepteurs (effet indirect) vis-à-vis d'autres stimuli. C'est notamment le cas pour les nocicepteurs « silencieux », qui voient leurs seuils de sensibilités mécaniques et thermiques abaissés en présence de médiateurs inflammatoires (Julius et Basbaum, 2001 ; McMahon et al., 2005 ; Basbaum et al., 2009).

In vivo, la plupart de ces composés tels que, l'ATP (Bleehen et Keele, 1977 ; Hamilton et al., 2000 ; Souslova et al., 2000 ; Malin et al., 2008), la bradykinine (Manning et al., 1991 ; Couture et al., 2001 ; Fein, 2012), les amines (Tokunaga et al., 1998 ; Zeitz et al., 2002 ; Mizumura et al., 1995), les cytokines (Fukuoka et al., 1994 ; Jin et Gereau, 2006 ; Zhang et An, 2007 ; De Oliveira et al., 2011), le NGF (Lewin et al., 1993 ; Petty et al., 1994) et l'oxyde nitrique (Holthuisen et Arndt, 1994 ; Nakamura et al., 1996 ; Miyamoto et al., 2009) ont été impliqués dans des douleurs inflammatoires et dans des hyperalgies thermiques chaudes et mécaniques.

Les actions de l'ensemble des médiateurs de la soupe inflammatoire sont regroupées sur le schéma : « Médiateurs inflammatoires et nocicepteur » [**Figure 11**].

Les médiateurs inflammatoires participent non seulement à l'activation et/ou à la sensibilisation des nocicepteurs de manière conventionnelle, mais aussi de manière antidromique. En effet, lors d'une inflammation, il y a une activation antidromique (*i.e.*, du corps cellulaire vers la périphérie) des nocicepteurs, entraînant la libération de neuropeptides (SP et CGRP) à l'origine de l'inflammation neurogène (*i.e.*, dégranulation des mastocytes, vasodilatation, œdème) et de l'hyperalgie [**Figure 11**] (Basbaum et Jessell, 2013).

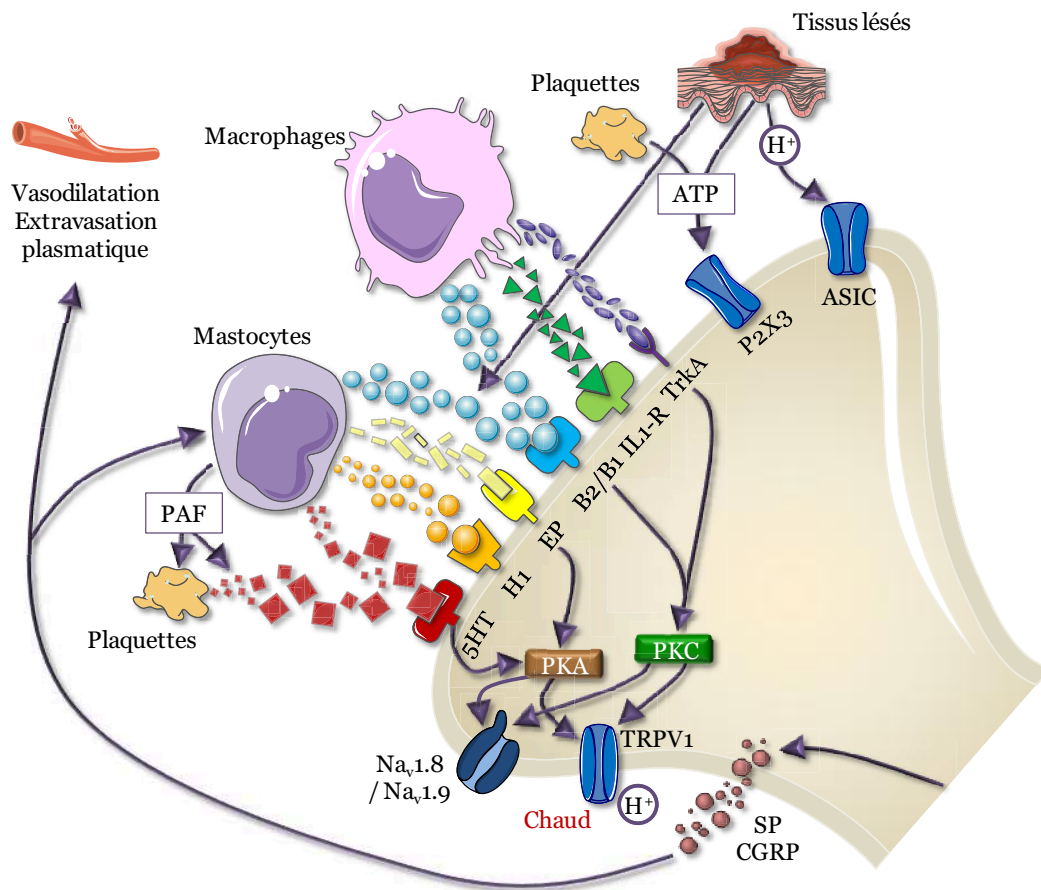


Figure 11 : Médiateurs inflammatoires et nocicepteur.

L'inflammation conduit à la libération de nombreux composés chimiques par les macrophages, les mastocytes, les cellules immunitaires et les cellules lésées. Ces composés peuvent agir directement ou indirectement pour modifier la sensibilité des terminaisons nerveuses périphériques.

Abréviation : 5HT : sérotonine (rouge) ; H1 : histamine (orange) ; EP : récepteur aux prostaglandines (jaune) ; B2/B1 : récepteur à la bradykinine (bleu clair) ; IL1 : Interleukine-1 β (vert) ; TrkA : récepteur à activité tyrosine kinase A du NGF (violet) ; P2X3 : récepteur ionotrope de l'ATP ; ASIC : « Acid-Sensing Ion Channel » ; TRPV1 : « Transient Receptor Potential Vanilloid 1 » ; PAF : facteur d'activation plaquettaire ; PKA/PKC : protéine kinase A/C ; SP : substance P ; CGRP : peptide relié au gène calcitonine ; ATP : adénosine triphosphate.

(D'après Meyer et al., 2006).

Lors de ma thèse je me suis principalement focalisé sur la régulation des canaux ASIC (« Acid-Sensing Ion Channel »), par les protons et les lipides, c'est pourquoi dans ce chapitre je développerai particulièrement l'action de ces deux composés.

Les protons :

Dans de nombreuses conditions physiopathologiques, telles qu'une inflammation (Punmia-Moorthy, 1987), une tumeur (Warburg et al., 1924 ; Garber, 2003) ou une ischémie (Jacobus et al., 1977 ; Pan et al., 1999), le pH extracellulaire diminue plus ou moins drastiquement. Lors d'une inflammation, les cellules lésées vont libérer des protons, engendrant une forte diminution du pH (*i.e.*, jusqu'à pH 4.7) dans les tissus enflammés [**Figure 11**] (Punmia-Moorthy, 1987 ; Steen et al., 1996).

Les protons peuvent sensibiliser ou activer les nocicepteurs en agissant sur différentes familles de canaux ioniques ou de récepteurs tels que les canaux TRP (« Transient Receptor Potential »), les canaux ASIC, les canaux potassiques à deux domaines pores ou K2P (« two-pore potassium channels »), les canaux potassiques à rectification entrante ou Kir (« inward-rectifier potassium ion channels ») et les RCPG (récepteurs couplés aux protéines G). Une diminution modérée (*i.e.*, pH 6.4) du pH extracellulaire potentialise les effets du chaud et de la capsaïcine sur les canaux TRPV1, alors qu'un pH inférieur à 6 les active directement. Parmi les senseurs du pH, on retrouve aussi des RCPG dont l'activité maximale a été enregistrée pour un pH de 6.8 (Ludwig et al., 2003) et les canaux ASIC (Waldmann et al., 1997a) qui sont les principaux senseurs de l'acidité et qui seront longuement décrits dans la partie « Les canaux ASIC » de cette introduction.

Enfin, les protons peuvent également faciliter l'excitabilité des nocicepteurs en jouant sur la durée de la dépolarisation membranaire en inhibant des canaux potassiques de fond (TREK-1, TASK-1, TASK-3 et Kir2.3) (Baumann et al., 2004 ; Cohen et al., 2009).

Les lipides inflammatoires - Acide arachidonique et lysophospholipides :

Lors d'une inflammation, des lipides membranaires libérés participent à la réaction inflammatoire. Ces lipides proviennent de l'hydrolyse des glycérophospholipides membranaires en position sn-2, par les sPLA2 (phospholipases A2 sécrétées). Il existe douze isoformes de sPLA2, parmi lesquelles la sPLA2 IIA (sPLA2 du groupe IIA) et la sPLA2 X (sPLA2 du groupe X) qui sont impliquées dans le processus inflammatoire et qui sont en lien avec mon travail de thèse (Lambeau et Gelb, 2008). Ces phospholipases peuvent être surexprimées (Andreani et al., 2000) et/ou suractivées (Ohtsuki et al., 2006 ; Pniewska et al., 2014) lors d'une inflammation, notamment sous l'action des cytokines IL-1 β , IL-6 (interleukine 6) et du TNF- α (Andreani et al., 2000).

L'hydrolyse des phospholipides membranaires conduit à la libération d'une chaîne d'acide gras et d'un lysophospholipide, avec un ratio d'un pour un [**Figure 12**]. L'acide gras majoritairement libéré lors d'une inflammation, notamment par la sPLA2 X, est l'acide arachidonique (AA) (Lambeau et Gelb., 2008).

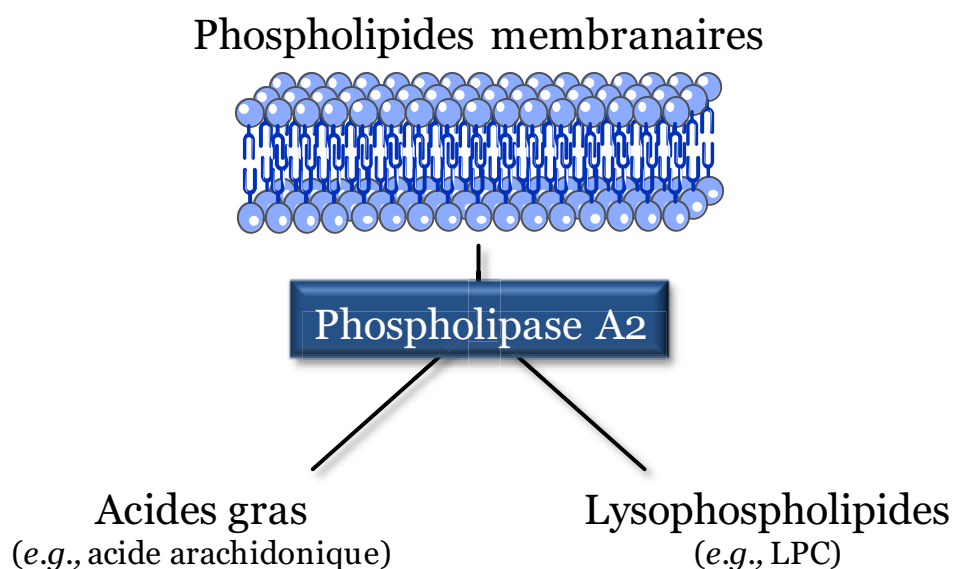


Figure 12 : Hydrolyse des phospholipides membranaires.

Lors d'une inflammation, la sur-activation des phospholipases A2 conduit à l'hydrolyse des phospholipides membranaires et donc par conséquent à la libération d'une chaîne d'acide gras (*i.e.*, l'acide arachidonique) et d'un lysophospholipide.

(D'après Rao et Knaus, 2008).

L'AA est à l'origine de nombreux métabolites appartenant à la famille des eicosanoïdes qui regroupe les prostanoïdes et les leucotriènes (LT). Les prostanoïdes, favorisent les 4 signes de l'inflammation (rougeur, œdème, fièvre et douleur). Ils sont divisés en deux sous-classes de molécules : les prostaglandines (PG) et les thromboxanes (TX). Les prostanoïdes et les leucotriènes sont les produits respectifs de l'activité de deux familles d'enzymes, les cyclooxygénases ou COX et les lipoxygénases ou LOX [**Figure 13A**] (Vane, 1971 ; Rao et Knaus, 2008).

Les prostanoïdes :

L'acide arachidonique est oxydé et réduit en PGG₂ (prostaglandine G₂) puis en PGH₂ (prostaglandine H₂) via l'action des COX-1 et COX-2 (Smith et al., 1996). La COX-1 est exprimée de manière constitutive dans la majorité des cellules et des tissus, notamment dans les cellules endothéliales, les monocytes et les plaquettes, où elle est responsable de l'action physiologique des prostaglandines. A contrario, l'expression de la COX-2 est induite par les médiateurs pro-inflammatoires, notamment l'IL-1 β , le TNF- α et le NO. La COX-2 est la COX la plus largement impliquée dans la synthèse des prostaglandines pro-inflammatoires (Rao et Knaus, 2008).

A partir de la PGH₂, via l'action des prostaglandines synthases, vont être produits les prostaglandines (PGD₂, PGE₂, PGF₂ et PGI₂ ou prostacycline) dont les récepteurs sont respectivement le récepteur DP (PGD₂), les récepteurs EP₁₋₄ (PGE₂), le récepteur FP (PGF₂) et le récepteur IP (PGI₂). Parallèlement à l'action des prostaglandines synthases, via l'action de la thromboxane-A synthase, la PGH₂ va aussi pouvoir donner du TXA₂ (thromboxane A₂) qui agit sur son récepteur TP. L'ensemble de ces récepteurs sont des RCPG (Narumiya et FitzGerald, 2001 ; Ricciotti et FitzGerald, 2011).

Les PGE₂ et PGI₂ sont les deux principales prostaglandines pro-inflammatoires, l'activation de leur récepteur induit une activation des voies PKA et PKC, la formation d'IP₃ (inositol triphosphate) et la mobilisation du calcium intracellulaire. Les prostaglandines sensibilisent les nocicepteurs, en engendrant la libération de SP et de CGRP et en régulant positivement l'activité des canaux dépolarisants (*p. ex.*, Na_v1.8/1.9, TRPV₁ et TRPA₁) et négativement l'activité des canaux potassiques hyperpolarisants (*p. ex.*, TREK, VGKC) (Nicol et al., 1997 ; Lopshire et Nicol, 1998 ; Evans et al., 1999 ; Ricciotti et FitzGerald, 2011 ; Petho et Reeh, 2012).

L'injection de PGE₂ ou de PGI₂ induit chez les souris une hyperalgie thermique, qui est abolie lorsqu'elles sont invalidées pour les canaux TRPV1 (Moriyama et al., 2005). La PGE₂ est aussi impliquée dans le phénomène d'allodynie mécanique chez la souris (Kassuya et al., 2007).

Le TXA₂ provient essentiellement des plaquettes (Hamberg et al., 1975), bien que son rôle soit peu décrit, il a néanmoins été montré qu'il potentialise les effets de la bradykinine (Fu et Longhurst, 2010).

Les leucotriènes :

L'acide arachidonique peut être oxydé par trois lipoxgénases (5-LOX, 12-LOX et 15-LOX). Les leucotriènes, au nombre de quatre (leucotriènes B₄, C₄, D₄ et E₄) sont les produits de la 5-LOX (Petho et Reeh, 2012). Le principal leucotriène inflammatoire est le LTB₄ (leucotriène B₄) qui possède deux RCPG, les récepteurs BLT1 et BLT2 (Yokomizo et al., 1997 ; Yokomizo et al., 2000). Ses rôles majeurs sont de recruter les cellules de l'immunité au niveau du site inflammatoire (McMahon et al., 2006) et de stimuler la libération de PGE₂ par les macrophages (Elliott et al., 1991). Le LTB₄ peut activer les canaux TRPV1 engendrant ainsi un influx de calcium dans les nocicepteurs (Hwang et al., 2000 ; Andoh et Kuraishi, 2005). L'application de LTB₄ sur des nocicepteurs diminue les seuils de sensibilités mécaniques et thermiques chez le rat (Rackham et Ford-Hutchinson, 1983 ; Levine et al., 1984 ; Martin et al., 1988). Des résultats similaires suite à l'injection de LTB₄ chez l'homme ont permis de mettre en évidence son rôle dans l'hyperalgie thermique (Bisgaard et Kristensen, 1985).

Les lysophospholipides ou LPL :

L'hydrolyse des différents glycérophospholipides membranaires conduit à la production de lysophospholipides et d'acides gras. Les lysophospholipides correspondent aux glycérophospholipides auxquels une chaîne d'acide gras a été retirée. Les glycérophospholipides membranaires que sont la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine, le phosphatidylinositol et la phosphatidylsérine, donnent respectivement de la LPC (lysophosphatidylcholine), de la LPE (lysophosphatidyléthanolamine), du LPI (lysophosphatidylinositol) et de la LPS (lysophosphatidylsérine). En plus de ces 4 lysophospholipides, il peut y avoir production de LPA (acide lysophosphatidique). Du côté extracellulaire, la principale voie de production du LPA est celle d'un clivage de la tête polaire d'un LPL, notamment de la LPC, par l'autotaxine [**Figure 13B**] (Aoki, 2004).

Chez la souris, l'injection intraplantaire de LPA induit une douleur qui est partiellement inhibée lors de l'inhibition génique des récepteurs LPA1 (Renbäck et al., 1999 ; Renbäck et al., 2000), alors que son injection intrathécale induit une allodynie mécanique et une hyperalgie thermique. Le LPA, via son récepteur LPA1, mime les effets d'une lésion partielle du nerf sciatique induisant des douleurs neuropathiques (Inoue et al., 2004). De plus, il a également été montré que via ses récepteurs LPA1 et LPA3, le LPA était impliqué dans le développement des douleurs neuropathiques induites par un anticancéreux, le paclitaxel (Uchida et al., 2014). Outre son action, sur ses récepteurs, le LPA peut se fixer directement sur le canal TRPV1, au niveau de la partie C-terminale. Il induit alors une douleur spontanée chez la souris qui est significativement diminuée chez les souris KO TRPV1 (Nieto-Posadas et al., 2012). A contrario, plus récemment il a été suggéré que le LPA pourrait avoir un effet anti-nociceptif en activant les canaux potassiques de fond TRESK (« TWIK-related spinal cord potassium ») (Kollert et al., 2015).

A ce jour, parmi tous les LPL, seul le LPA a été impliqué dans les processus douloureux. Durant ma thèse j'ai pu montrer qu'un autre LPL, le LPC, était capable de générer un comportement douloureux chez les animaux, via le canal ASIC3 (Marra et al., 2016).

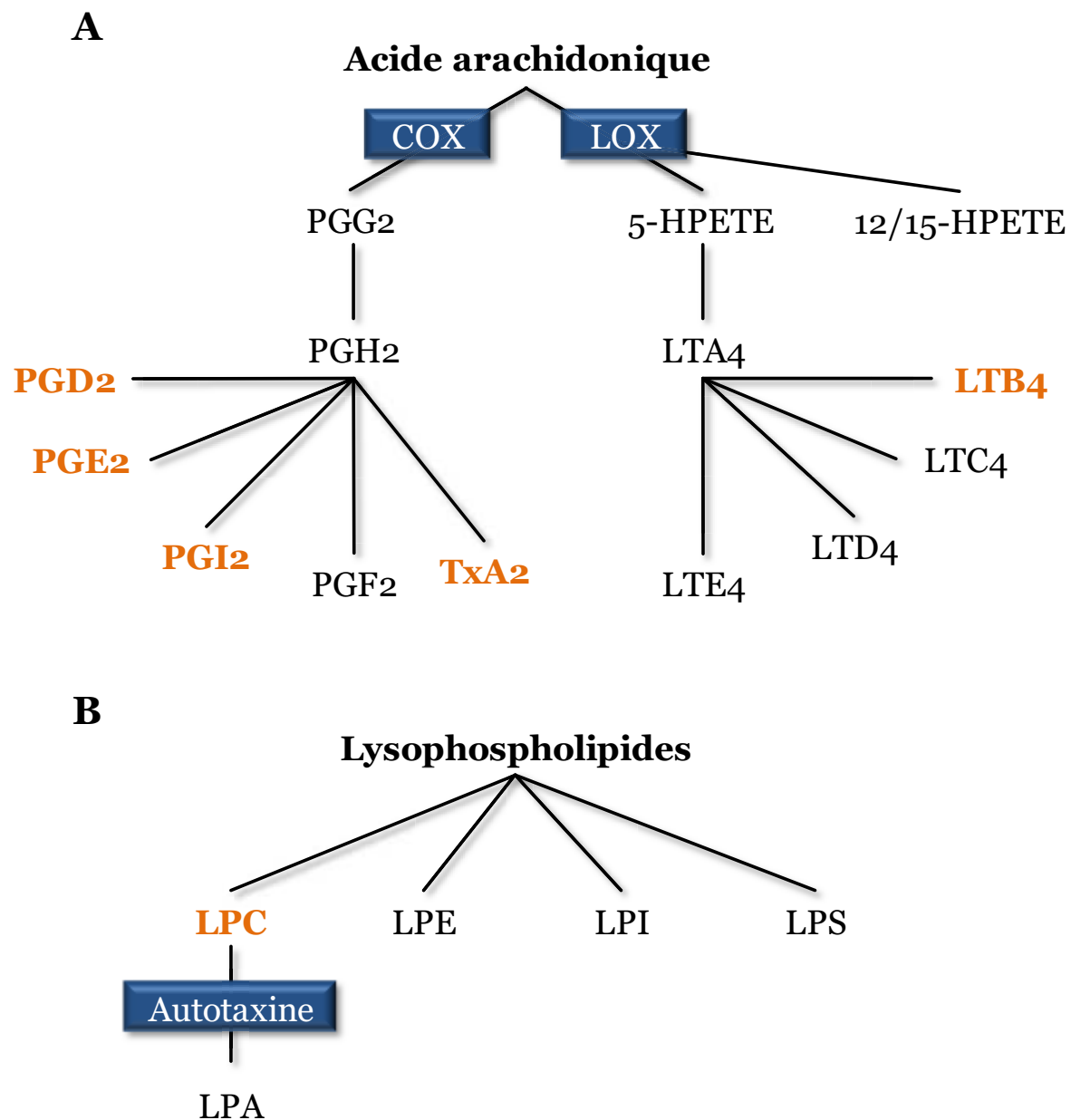


Figure 13 : Voies de production des lipides inflammatoires.

A. Voies de synthèse des prostaglandines et des leucotriènes sous l'action respective des cyclo-oxygénases (COX) et des lipoxygénases (LOX), à partir de l'acide arachidonique.

B. Différenciation des lysophospholipides selon leur tête polaire. Production de LPA à partir de LPC sous l'action de l'autotaxine.

Abréviation : PGX₂ : prostaglandine G/H/D/E/I/F₂ ; TxA₂ : thromboxane A₂ ; LTX₄ : leucotriène A/B/C/D/E₄ ; HPETE : acide hydroxyperoxyeicosatétraénoïque ; LPX : lysophosphatodyle/choline/éthanolamine/inositol/sérine ; LPA : acide lysophosphatidique.

(D'après Rao et Knaus, 2008).

Le PAF ou facteur d'activation plaquettaire :

Lors de l'hydrolyse des phospholipides membranaires par les PLA₂, il peut y avoir production de lyso-PAF, qui, suite à son acétylation, donne le PAF (Petho et Reeh, 2012). Le PAF possède de nombreux effets pro-inflammatoires. Il stimule la synthèse, des eicosanoïdes, des cytokines IL-1 β et TNF- α et la dégranulation des mastocytes (Poubelle et al., 1991 ; Marotta et al., 2009). Il est également impliqué dans la surexpression du récepteur B1 de la bradykinine (Fernandes et al., 2003) et stimule via son RCPG les voies PKA et PKC (Deo et al., 2004). Son injection chez l'animal provoque à la fois une douleur spontanée (léchage et levé de la patte) et des hyperalgies thermiques et mécaniques (Dallob et al., 1987 ; Schmelz et al., 1997 ; Marotta et al., 2009 ; Hasegawa et al., 2010).

c. Canaux ioniques : transduction et transmission du message douloureux

Au niveau des terminaisons nerveuses périphériques, les stimuli sensoriels et nocifs sont perçus et transduits en signal électrique. Les transducteurs de ces informations sont des canaux ioniques présents au niveau de la membrane des neurones. Les canaux ioniques peuvent être activés par un seul type de stimulation (*p. ex.*, température chaude) où peuvent être sensibles à divers stimuli (*p. ex.*, température chaude et proton). C'est grâce à la grande diversité des canaux ioniques décrits ci-après que l'organisme est capable de percevoir un large panel de sensations.

Lors de ma thèse je me suis principalement intéressé à la transduction des stimuli thermiques et chimiques.

La thermoperception est un processus hautement conservé depuis les bactéries jusqu'à l'homme. Elle permet à un organisme d'être informé d'un changement thermique dans son environnement interne ou externe, dans le but d'y répondre de manière adéquate (Vriens et al., 2014). La thermoperception est non seulement la résultante de la valeur absolue de la température, mais aussi de la vitesse, de l'amplitude et de la durée de la rampe appliquée, de la zone exposée et des expériences personnelles (Chery-Croze, 1983).

Le système somatosensoriel de l'être humain permet de distinguer sept modalités thermiques différentes que sont par ordre graduel : le froid brûlant, le froid nocif, le frais (ou froid non nocif), la température cutanée ou indifférente, le tiède (ou chaud non nocif), le chaud nocif et le chaud brûlant [**Figure 14**].

Cette distinction résulte de la différence entre la température de la peau (comprise entre 31 et 33°C) et celle de l'environnement ou d'un objet (Belmonte et Viana, 2008 ; Gardner et Johnson, 2013 ; McKemy, 2013 ; Vriens et al., 2014). Les thermorécepteurs possèdent une sensibilité si fine, qu'ils nous permettent de détecter des variations de température de 0.1°C, aussi bien vers un rafraîchissement que vers un réchauffement (Hensel et al., 1960).

Des études menées sur l'homme grâce à des questionnaires (Lewis et Love, 1926 ; Wolf et Hardy, 1941 ; Iggo, 1959), puis plus tard grâce à des tests psychophysiques associés à de l'imagerie (IRM) ont montré que les températures comprises dans une gamme allant d'environ 15 à 43°C sont considérées par les sujets comme non nocives (Erpelding et al., 2012). Il est possible de classer les sept modalités thermiques évoquées précédemment le long d'une échelle de température [**Figure 14**] :

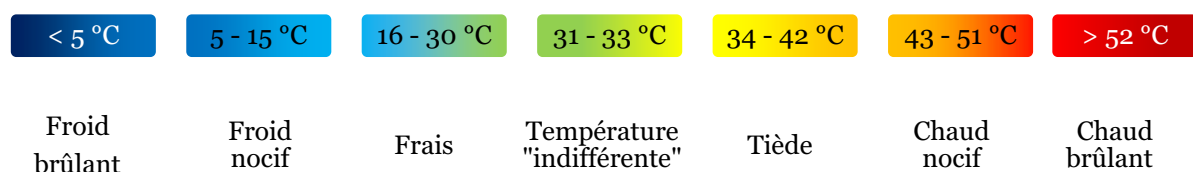


Figure 14 : Échelle des températures corporelles

Gradient de température de la peau, allant du froid brûlant au chaud brûlant.

(D'après : Darian-Smith et Johnson, 1977 ; Belmonte et Viana, 2008 ; Erpelding et al., 2012)

i. Thermotransduction chaude

Les canaux ioniques activés par la chaleur présentent des seuils d'activation différents, permettant de ressentir des températures allant du tiède (25°C) au chaud extrême (supérieur à 52°C) en passant par le chaud nocif (supérieur à 43°C).

La majorité des canaux senseurs de stimuli thermiques chauds appartiennent à la famille des canaux TRP [**Figure 15**]. Les canaux TRP décrits ci-après sont tous retrouvés au niveau des neurones sensoriels, à l'exception de TRPM5 (« Transient Receptor Potential Melastatin ») qui est présent au niveau des récepteurs gustatifs (Talavera et al., 2005).

Les canaux TRP : TRPV, TRPM et TRPA

Le premier membre de cette famille à avoir été identifié comme senseur du chaud est le canal TRPV1 qui s'active à partir de 43°C. Les canaux TRPV1 d'abord nommés VR1 (récepteur aux vanilloïdes) sont également activés par la capsaïcine, un composé irritant du piment (Caterina et al., 1997 ; Tominaga et al., 1998).

Les souris KO TRPV1 ne présentent pas de différence de perception thermique en-dessous de 50°C, mais elles sont moins sensibles que les souris sauvages au-delà de cette température. Elles ne développent pas non plus d'hyperalgie thermique suite à l'injection de carragénine (Caterina et al., 2000 ; Davis et al., 2000).

Les canaux TRPV1 sont les principaux senseurs du chaud nocif.

Dans la sous-famille des canaux TRPV (TRPV1-6), les canaux TRPV2, TRPV3 et TRPV4 sont également activés par le chaud avec des seuils d'activation respectifs de 52°C (Caterina et al., 1999), 33 à 35°C (Peier et al., 2002 ; Smith et al., 2002 ; Xu et al., 2002) et 25 à 34°C (Güler et al., 2002 ; Watanabe et al., 2002).

Alors que les premiers résultats obtenus chez les souris KO suggéraient une implication *in vivo* des canaux TRPV3 et TRPV4 dans la perception thermique chaude (Lee et al., 2005 ; Moqrich et al., 2005), des études plus récentes ont remis en questions ces résultats. Les auteurs n'observent que peu de différences comportementales chez les souris KO TRPV3 et TRPV4 (Huang et al., 2011 ; Miyamoto et al., 2011).

Les souris KO TRPV2 présentent elles aussi une thermoperception qui n'est pas altérée, suggérant que *in vivo* les canaux TRPV2 ne sont pas impliqués dans la thermoperception (Park et al., 2011). *In vitro*, les canaux TRPV1 et TRPV2 seraient plutôt des senseurs du chaud nocifs, alors que les canaux TRPV3 et TRPV4 seraient des senseurs du chaud non nocif (tiède).

Outre les canaux TRPV, des canaux de la sous-famille TRPM (TRPM2-5) et TRPA1 (« Transient Receptor Potential Ankyrin 1 ») peuvent être activés par des températures chaudes (Talavera et al., 2005 ; Togashi et al., 2006 ; Vriens et al., 2011).

Les souris KO TRPM2 présentent un déficit de perception des températures chaudes non nocives (Tan et McNaughton, 2016). Les souris KO TRPM3 ont un phénotype similaire à celui des souris KO TRPV1 (Vriens et al., 2011).

Les canaux TRPM3 sont impliqués dans la détection du chaud nocif, alors que les canaux TRPM2, TRPM4 et TRPM5 sont plutôt impliqués dans la détection des températures non nocives.

Enfin, chez l'homme, les canaux TRPA1, longtemps considérés comme des senseurs du froid, sont également capable d'être activés par des stimulations chaudes selon l'état d'oxydoréduction (Moparthi et al., 2016).

Les canaux ANO1

Au niveau des neurones DRG, plus particulièrement dans les neurones nociceptifs, les canaux ANO1 (« anoctamin-1 ») s'activent à partir de 44°C. L'utilisation de méfloquine (un inhibiteur des canaux ANO1), de siRNA dirigée contre ANO1 et de KO conditionnel ont permis la mise en évidence d'un rôle d'ANO1 dans la perception du chaud nocif, dans l'hyperalgie thermique inflammatoire induite par la carragénine et dans les douleurs neuropathiques (Cho et al., 2012 ; Lee et al., 2014).

Les canaux K₂P

Les canaux K₂P sont des canaux potassiques de fond. Parmi l'ensemble des canaux K₂P, trois membres : TREK-1/-2 (« TWIK related K⁺ channel-1/-2 ») et TRAAK (« TWIK-related arachidonic acid activated K⁺ channel ») sont impliqués dans la thermoperception chaude. Bien qu'ils ne soient pas considérés comme de véritables senseurs du chaud, ces canaux sont activés entre 17 et 42°C, avec une activité maximale à 37°C (Maingret et al., 2000a ; Kang et al., 2005 ; Noël et al., 2009 ; Pereira et al., 2014). Ils participent à l'établissement du seuil de perception thermique et la régulation thermo-dépendante de l'excitabilité des neurones sensoriels. Leur délétion entraîne chez les animaux une hypersensibilité au chaud (Alloui et al., 2006 ; Noël et al., 2009 ; Pereira et al., 2014).

La grande diversité des canaux ioniques sensibles au chaud permet d'expliquer la transduction et la transmission des messages sensoriels et nociceptifs en réponse à une stimulation chaude plus ou moins intenses.

ii. Thermotransduction froide

Les senseurs du froid permettent de ressentir des températures allant de du frais (27°C) au froid brûlant (inférieur à 5°C). Similairement à la thermotransduction chaude, les principaux canaux impliqués dans la transduction des stimuli froids appartiennent à la famille des canaux TRP [**Figure 15**].

Les canaux TRP : TRPM, TRPA et TRPC

Les canaux TRPM8 sont les premiers senseurs du froid à avoir été identifiés et sont depuis considérés comme « LES » senseurs du froid. Ces canaux ont un seuil d'activation qui se situe entre 27 et 23°C etaturent aux alentours de 8°C (McKemy et al., 2002 ; Peier et al., 2002). Ils ne sont présent que dans une faible population (5-10%) des neurones DRG et ne co-localisent que très peu avec TRPV1 (Peier et al., 2002 ; Karashima et al., 2009).

Les souris KO TRPM8 présentent un déficit de perception thermique dans la gamme de température fraîche / froide non nocive entre 30 et 18°C.

Cependant leur capacité de ressentir le froid nocif (inférieur à 15°C) n'est pas (ou peu) altérée (Colburn et al., 2007 ; Dhaka et al., 2007 ; Bautista et al., 2007 ; Knowlton et al., 2010).

Chez la souris, l'injection de formaline induit un comportement douloureux en deux phases successives (aigüe et inflammatoire). Dans ce test le froid possède sur la phase aigüe un effet analgésique, qui met en jeu les canaux TRPM8 (Dhaka et al., 2007).

Les canaux TRPA1, comme les canaux TRPM8, répondent au froid, mais leur seuil de sensibilité est plus bas que pour ces derniers. Leur seuil d'activation se situe aux alentours de 17°C suggérant un rôle dans la perception du froid nocif. De plus les canaux TRPA1 co-localisent avec les canaux TRPV1 dans les neurones nociceptifs impliqués dans la thermo-nociception (Story et al., 2003).

Cependant leur rôle, *in vivo*, dans la thermo-nociception n'est pas clair. Les données obtenues grâce aux souris KO TRPA1 divergent, aboutissant à une controverse. Certaines études montrent clairement un déficit de perception du froid nocif chez les souris KO TRPA1 (Kwan et al., 2006 ; Karashima et al., 2009), alors que d'autres montrent une réponse non altérée quelque soit la température (Bautista et al., 2006 ; Knowlton et al., 2010). Les souris double KO TRPM8/TRPA1 présentent une sensibilité au froid similaire aux souris KO TRPM8, ce qui semble confirmer le faible rôle des canaux TRPA1, *in vivo*, dans la perception du froid (Knowlton et al., 2010).

Les canaux TRPC5 sont également sensibles au frais entre 37 et 25°C, mais leur délétion n'entraîne pas de modification de la perception du froid chez les souris KO TRPC5 par rapport aux souris sauvages. Bien que ces canaux semblent participer à la détection globale de la température, *in vivo*, ils ne seraient pas des thermo-senseurs (Zimmermann et al., 2011).

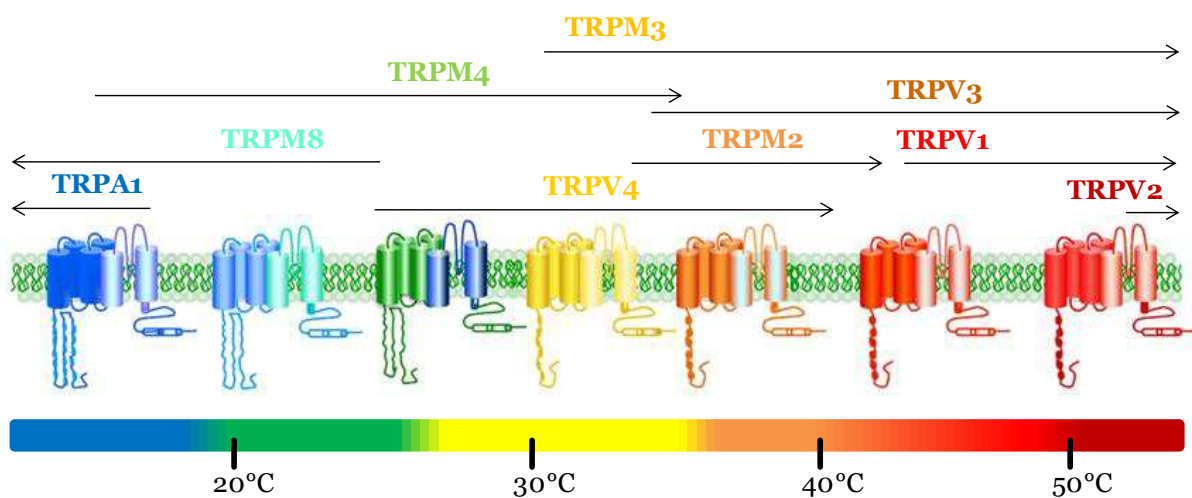


Figure 15 : Canaux TRP et thermoperception.

Les canaux de la famille des TRP sont les principaux senseurs de température. Chaque canal présente un seuil d'activation thermique qui lui est propre. Ils permettent de percevoir l'ensemble des sensations thermiques nocives et non-nocives du froid brûlant (TRPA1) au chaud brûlant (TRPV2).

(D'après Latorre et al., 2009 ; Ferrandiz-Huertas et al., 2014 ; Mickle et al., 2015).

Les canaux K₂P

Comme évoqué précédemment pour la thermotransduction chaude, les canaux K₂P participent à la sensibilité au froid. Les canaux TREK-1 et TRAAK participent conjointement à la perception du froid, alors que chacun pris séparément n'a aucun effet sur celle-ci. Ce ne sont pas des senseurs du froid, mais ils participent à la régulation thermo-dépendante de l'excitabilité neuronale entre 20 et 10°C, de manière identique à leur rôle dans la perception thermique chaude (Noël et al., 2009). Les canaux TREK-2 jouent le même rôle que les canaux TREK-1 et TRAAK mais pour des températures plus élevées et donc par conséquent non nocives, comprises entre 25 et 20°C (Pereira et al., 2014).

Les canaux Na_v

Les canaux Na_v1.8 et 1.9, deux isoformes de canaux sodiques dépendants du potentiel et résistants à la TTX (tétrodotoxine) sont présents au niveau des neurones DRG et plus particulièrement des nocicepteurs (Catterall et al., 2005a). Les canaux Na_v participent généralement à la génération et la transmission de l'influx nerveux. Les Na_v1.8 et Na_v1.9 participent à la perception du froid nocif et au comportement douloureux induit par celui-ci (Zimmermann et al., 2007 ; Lollignier et al., 2015).

En condition de température froide nocive, les canaux Na_v1.8 sont les seuls capables de générer des PA. Ils sont donc indispensables au maintien de l'excitabilité des nocicepteurs lorsque la température diminue. Leur ablation entraîne chez la souris une réponse négligeable vis-à-vis du froid nocif (Zimmermann et al., 2007).

Les canaux Na_v1.9 agissent de concert avec les Na_v1.8 en jouant le rôle d'amplificateur de la dépolarisation induite par les canaux transducteurs du froid. Les souris KO Na_v1.9 sont moins sensibles au froid nocif inférieur à 12°C (Lollignier et al., 2015).

La perception du froid, qu'il soit ou non nocif, est permis à la fois grâce à des canaux transducteurs des stimuli froids et à des canaux qui participent à l'excitabilité neuronale. L'ensemble des résultats décrits ci-dessus suggèrent qu'il pourrait exister d'autres canaux impliqués dans la perception du froid, notamment du froid nocif.

iii. Chémotransduction

Les canaux ioniques impliqués dans la chémotransduction sont des canaux activés par des stimuli chimiques qu'ils soient endogènes ou exogènes. Dans cette partie je ne m'intéresserai, de manière non exhaustive, qu'aux chémotransducteurs activés par des médiateurs de la soupe inflammatoire.

Les canaux ASIC

Les canaux ASIC sont activés par les protons extracellulaires (Price et al., 1996 ; Waldmann et al., 1996 ; Waldmann et al., 1997a). Ces canaux qui sont les principaux détecteurs de l'acidose extracellulaire et sur lesquels j'ai focalisé mon attention durant ma thèse seront détaillés dans la partie « B – Les Canaux ASIC ».

Les canaux TRP : TRPV1 et TRPA1

Les canaux TRPV1 qui sont essentiellement connus pour leur rôle dans la perception thermique, peuvent également être activés par différents composés de la soupe inflammatoire, tels que les protons, les lipides et le NO. Parallèlement à la découverte de leur sensibilité au chaud, les mêmes auteurs ont montré qu'une diminution du pH extracellulaire de pH 7.4 à pH 5.9 et en-deçà, générerait une activation indépendante de la capsaïcine et de la chaleur (Caterina et al., 1997 ; Tominaga et al., 1998).

Ces canaux peuvent également être activés par des lipides inflammatoires produits par la dégradation des phospholipides membranaires. Les canaux TRPV1 sont activés par des métabolites de l'AA tels que le 12-HPETE et d'autres produits issus de la voie des lipoxygénases (Hwang et al., 2000). Ils sont également sensibles au LPA provenant du clivage de la LPC. Le LPA induit un comportement de douleur aiguë chez les souris qui implique les canaux TRPV1 (Nieto-Posadas et al., 2012).

Enfin à de fortes concentrations (plusieurs mM) un donneur de NO, le SNAP (S-nitroso-N-acetylpenicillamine), active les canaux TRPV1 et induit une hyperalgie thermique (Miyamoto et al., 2009).

Les canaux TRPA1 sont sensibles à de très nombreux composés naturels forts/âcres présents dans les huiles de moutarde ou de clou de girofle, dans la cannelle, le gingembre et l'ail. Parmi les composés inflammatoires, la bradykinine, des produits du stress oxydatif, l'acide arachidonique et des métabolites des prostaglandines sont des activateurs endogènes des canaux TRPA1. L'activation par la bradykinine nécessite la présence de son récepteur B2 (Bandell et al., 2004 ; Bautista et al., 2005). L'acide arachidonique et les métabolites des prostaglandines PGE2 et PGD2 retrouvés à des niveaux élevés durant l'inflammation sont capables de stimuler les nocicepteurs en activant les canaux TRPA1, générant un comportement de douleur aiguë chez la souris (Bandell et al., 2004 ; Cruz-Orengo et al., 2008 ; Taylor-Clark et al., 2008 ; Motter et Ahern, 2012).

Enfin l'acide oléique nitraté, un composé issu du NO et du stress azoté et le 4-hydroxynonanal issu du stress oxydatif activent les canaux TRPA1 (Trevisani et al., 2007 ; Taylor-Clark et al., 2009). Les protons extracellulaires sont capables d'activer spécifiquement l'isoforme humaine des canaux TRPA1 (de la Roche et al., 2013).

Les récepteurs purinergiques : P2X3 et P2X2/3

Au niveau cutané chez l'homme, l'ATP induit une sensation de douleur brûlante (Hamilton et al., 2000b). Dans les neurones nociceptifs, les récepteurs P2X3 et P2x2/3 sont responsables de la majorité des courants induits par l'ATP (Chen et al., 1995 ; Lewis et al., 1995 ; Burgard et al., 1999 ; Cockayne et al., 2005). L'activation des récepteurs P2X génère un comportement douloureux spontané (levé de la patte) chez les rongeurs. Cette douleur est abolie grâce à l'inhibition pharmacologique ou génique des récepteurs P2X3. De plus, l'inhibition de ces récepteurs empêche le développement d'hyperalgies thermiques et mécaniques aussi bien en conditions naïve, qu'inflammatoire ou neuropathique (Barclay et al., 2002 ; Honore et al., 2002 ; Tsuda et Inoue, 2006).

Les récepteurs sérotoninergiques : 5-HT2A et 5-HT3

Parmi l'ensemble des récepteurs sérotoninergiques, les récepteurs 5-HT2A et 5-HT3 sont les deux plus impliqués dans le processus douloureux au niveau des nocicepteurs (Sufka et al., 1992 ; Abbott et al., 1996 ; Tokunaga et al., 1998 ; Zeitz et al., 2002).

L'injection de sérotonine induit chez le rat un comportement de douleur spontanée (léchage et levé de la patte) abolit par des inhibiteurs des récepteurs 5-HT₂ et 5-HT₃ (Sufka et al., 1992 ; Obata et al., 2000). L'activation des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2A} au niveau périphérique induit des hyperalgésies et/ou des allodynies mécaniques et thermiques (Tokunaga et al., 1998 ; Sasaki et al., 2006).

Les canaux K₂P :

Les canaux TREK₁, TREK₂ et TRAAK sont sensibles aux protons intracellulaires et extracellulaires, ainsi qu'aux lipides inflammatoires.

Alors qu'une acidose extracellulaire inhibe les canaux TREK₁ et TRAAK, celle-ci active les canaux TREK₂ (Sandoz et al., 2009). A contrario une alcalinisation du milieu extracellulaire active les canaux TREK₁ (Cohen et al., 2008). Au niveau intracellulaire, les canaux TREK₁ et TREK₂ sont activés par un pH acide, alors que les canaux TRAAK sont eux activés par un pH alcalin (Maingret et al., 1999 ; Kim et al., 2001).

Outre leur sensibilité aux protons, les canaux de la famille des K₂P sont également activés par les acides gras polyinsaturés et plus particulièrement l'acide arachidonique. L'action de l'AA semble être dû à un effet direct sur le canal, car il est maintenu en configuration de patch-clamp excisé (Fink et al., 1998 ; Patel et al., 1998 ; Patel et al., 2001). Parmi les lipides inflammatoires la LPC est également capable d'activer les canaux K₂P, mais cet effet ne serait pas direct, il serait dû à une déformation membranaire (Maingret et al., 2000b).

De nombreux canaux ioniques et récepteurs présents à la surface des neurones sensoriels, en particulier des nocicepteurs, sont donc activés ou inhibés par des médiateurs inflammatoires et participent ainsi à la transduction de ces stimuli chimiques. Leurs rôles dans la perception douloureuse ont pu être caractérisés grâce à l'utilisation d'outils pharmacologiques et géniques. Parmi ces canaux, on retrouve les canaux ASIC auxquels je me suis particulièrement intéressé durant ma thèse.

B- LES CANAUX ASIC

Dans de nombreuses conditions douloureuses et/ou pathologiques telles qu'une inflammation, une fracture, le développement de certaines tumeurs (Warburg et al., 1924 ; Garber, 2003), une ischémie (Jacobus et al., 1977 ; Pan et al., 1999) ou encore suite à une intervention chirurgicale, il y a une acidose tissulaire qui se produit (Deval et al., 2010 ; Deval et al., 2011). Réciproquement, l'infusion intradermique d'une solution acide (pH 5.2) chez l'homme induit une sensation douloureuse (Steen et Reeh, 1993).

Entre acidité et douleur, il existe donc un lien qui met en jeu des canaux ioniques et notamment les canaux ASIC. Durant ma thèse, je me suis intéressé à l'étude de ces canaux qui sont comme leur nom l'indique, des senseurs d'acidité et qui sont impliqués dans la perception douloureuse.

1. Découverte et phylogénie

Les canaux ASIC appartiennent à la superfamille des canaux ENaC/DEG (« epithelial sodium channel/degenerin ») mise en évidence au début des années 1990 [**Figure 16**]. Tous les membres de cette famille présentent deux caractéristiques communes. Premièrement ce sont tous des canaux cationiques principalement sodiques et deuxièmement ils sont tous sensibles à l'amiloride (Waldmann et Lazdunski, 1998 ; Kellenberger et Schild, 2002).

Les canaux de cette famille peuvent être activés de trois manières différentes :

- soit de manière constitutive, c'est le cas du canal ENaC, qui est impliqué dans la réabsorption du sodium chez les mammifères (Canessa et al., 1993 ; Lingueglia et al., 1993).
- soit par un ligand, c'est le cas des canaux ASIC (activés par les protons) et du canal FaNaC (« FMRF-amide-activated sodium channel ») qui est activé par un neuropeptide, le FMRFamide (phénylalanine-méthionine-arginine-phénylalanine) dans les neurones de l'escargot *Helix aspersa* (Lingueglia et al., 1995).
- soit par un stimulus mécanique, c'est notamment le cas des canaux DEG-1 (« degenerin 1 ») et MEC-4 (« mechano-electrical transduction channel 4 ») dont les mutations entraînent des neurodégénération chez le nématode *C. elegans* (Chalfie et Wolinsky, 1990 ; Driscoll et Chalfie, 1991 ; Garcia-Anoveros et Corey, 1997).

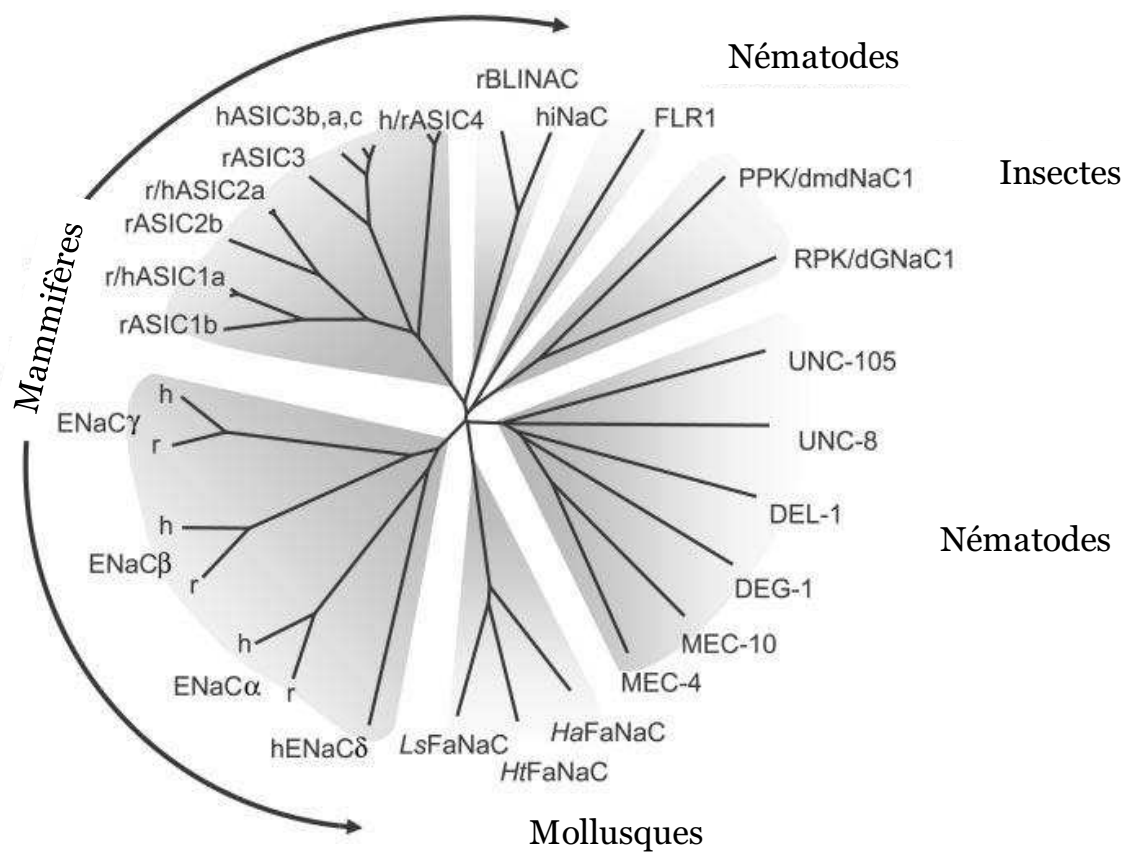


Figure 16 : Superfamille des canaux ENaC/DEG.

Arbre phylogénétique des canaux ENaC/DEG auquel appartiennent les canaux ASIC.
(D'après Kellenberg et Schild 2002).

L'histoire des canaux ASIC commence à la fin des années 1970 lors d'une étude de dose réponse à la sérotonine réalisée par l'équipe du Pr Oleg Krishtal. Suite à l'omission d'un tampon dans une solution contenant de la sérotonine, celle-ci devint acide et engendra l'activation d'un « récepteur des protons » (Krishtal et Pidoplichko, 1980). L'année d'après, les mêmes auteurs démontrent que ce récepteur est principalement perméable au sodium (Krishtal et Pidoplichko, 1981a), mais peut également laisser passer du calcium (Kovalchuk et al., 1990).

De part sa localisation dans les neurones DRG et trigéminaux, ce canal pourrait participer à la nociception (Krishtal et Pidoplichko, 1981a ; Krishtal et Pidoplichko, 1981b). L'activité du récepteur des protons est bloquée par l'amiloride, un composé utilisé comme diurétique [**Figure 17**] (Glitzer et Steelman, 1966 ; Korkushko et Kryshtal, 1984).

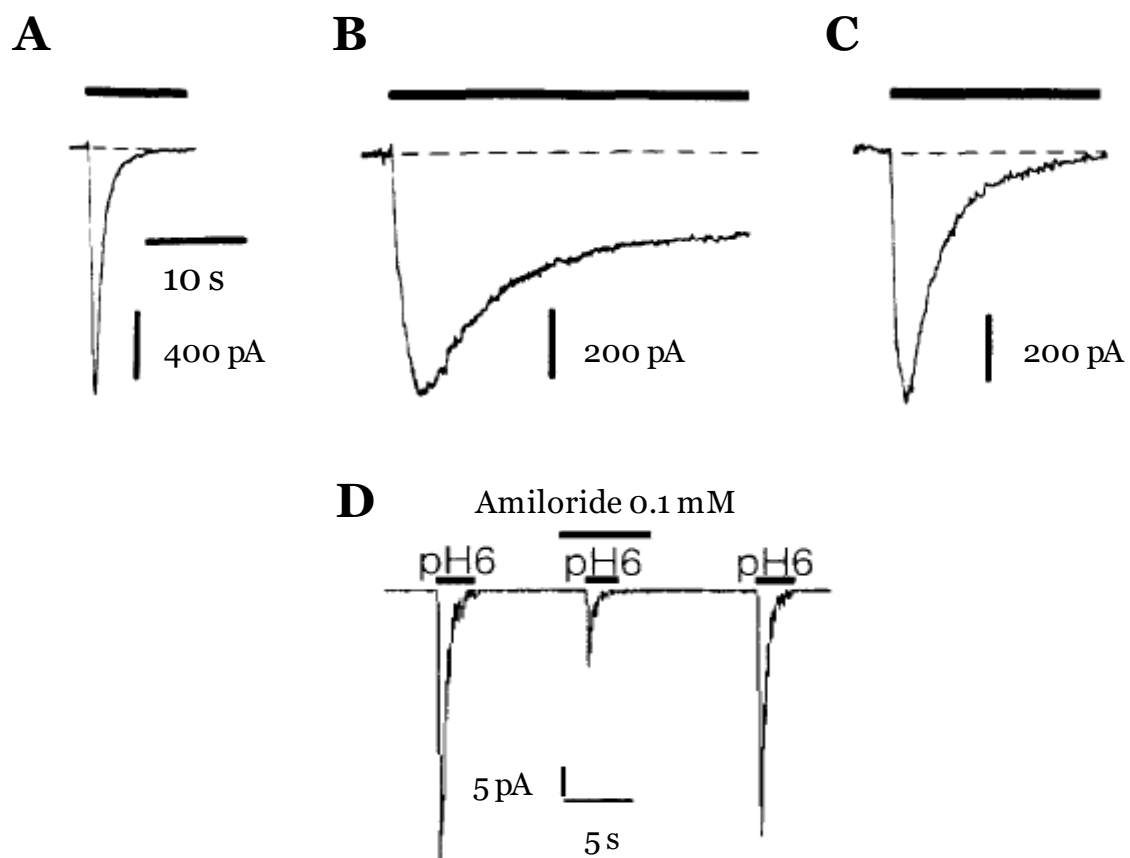


Figure 17 : Enregistrements des courants du « récepteur des protons ».

A. B. C. Différentes cinétiques de courants obtenus en réponse à l'application d'une solution acide sur des neurones DRG.

D. Blocage partiel de l'activité des canaux ASIC natifs suite à l'application d'amiloride à 0.1 mM.

(D'après Krishtal et Pidoplichko, 1981b ; Waldmann et al., 1997a).

Une étude menée en 1997 à l'IPMC (Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire) par l'équipe du Pr Michel Lazdunski a permis d'identifier pour la première fois le récepteur des protons, qui fut alors baptisé canal ASIC (Waldmann et al., 1997a). Ce canal ASIC nommé ASIC1a, bien qu'étant le premier à être publié dans la littérature sous ce nom, n'est en réalité pas le premier membre de la famille ASIC à avoir été découvert.

En effet, un an auparavant un canal cationique neuronal sensible à l'amiloride a été cloné simultanément par deux équipes et nommé BNC1 (« brain sodium channel 1 ») (Price et al., 1996) ou MDEG (« mammalian degenerin ») (Waldmann et al., 1996). Quelques mois après le clonage d'ASIC1, il a été montré que le canal BNC1/MDEG était lui aussi activé par les protons et présentait 67% d'homologie avec le canal ASIC1. Les canaux BNC1/MDEG furent alors renommés canaux ASIC2 (Lingueglia et al., 1997 ; Waldmann et Lazdunski, 1998).

Un autre membre de la famille ASIC avait été initialement observé en 1991 dans les neurones DRG (Bevan et Yeats, 1991). Il s'agissait d'une conductance activée en réponse à une acidification extracellulaire. Le canal responsable de ce courant biphasique fut cloné en 1997 par l'équipe du Pr Lazdunski. D'abord nommé canal DRASIC (« dorsal root ASIC »), il porte désormais le nom de canal ASIC3 (Waldmann et al., 1997b ; Waldmann et Lazdunski, 1998).

Enfin, au début des années 2000, un quatrième membre de la famille ASIC possédant 44% d'homologie avec ses prédécesseurs a été identifié et nommé canal ASIC4 ou SPASIC (« spinal cord ASIC »). Ce canal fortement exprimé dans le système nerveux central, notamment au niveau de l'hypophyse n'est pas sensible aux protons et ses propriétés restent pour l'heure mal connues (Gründer et al., 2000 ; Akopian et al., 2000 ; Du et al., 2014).

Les canaux ASIC1, ASIC2, ASIC3 et ASIC4 sont respectivement codés par les gènes ACCN2, ACCN1, ACCN3, ACCN4 (« amiloride-sensitive cation channel neuronal 1-4 ») (source IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY). L'inversion des chiffres 1 et 2 entre gènes et canaux s'expliquent par la chronologie des découvertes, le canal ASIC2 a été identifié en premier, son gène porte donc le numéro 1.

2. Propriétés des canaux ASIC

Les canaux ASIC présentent des différences structurales et fonctionnelles, qui sont à l'origine d'une grande diversité de courants et d'implications physiologiques.

a. Propriétés structurales

i. Les différentes sous-unités ASIC

La diversité des canaux ASIC ne se limitent aux quatre isoformes ASIC1, ASIC2, ASIC3 et ASIC4 cités précédemment. En effet, les gènes (ACCN1-4) qui codent pour ces canaux peuvent subir des épissages qui conduisent à l'expression de différents variants.

Chez l'homme et les rongeurs, deux variants d'ASIC1 : ASIC1a (ou ASIC, ASIC α , BNaC2 α) (Garcia-anoveros et al., 1997 ; Waldmann et al., 1997a) et ASIC1b (ou ASIC β , BNaC2 β) (Chen et al., 1998 ; Bässler et al., 2001), ainsi que deux variants d'ASIC2 : ASIC2a (ou MDEG1, BNaC1 α , BNC1a) (Price et al., 1996 ; Waldmann et al., 1996a ; Waldmann et al., 1996b ; Garcia-anoveros et al., 1997) et ASIC2b (ou MDEG2, BNaC1 β) (Lingueglia et al., 1997) ont été identifiés. Les rongeurs présentent également une isoforme d'ASIC3 (ou DRASIC, TNaC1) (Waldmann et al., 1997b ; Ishibashi et Marumo, 1998) et une isoforme d'ASIC4 (ou SPASIC) (Akopian et al., 2000 ; Gründer et al., 2000).

Chez l'homme, en plus des deux variants d'ASIC1 et d'ASIC2 qui se différencient au niveau du domaine N-terminal (Sherwood et al., 2012), il existe trois variants d'ASIC3 nommés ASIC3a, 3b et 3c qui se différencient au niveau de la partie C-terminale (DeWeille et al., 1998 ; Ishibashi et Marumo, 1998 ; Babinski et al., 1999 ; Deval et al., 2010) et deux variants d'ASIC4 qui se différencient au niveau de la boucle extracellulaire (Akopian et al., 2000 ; Gründer et al., 2000 ; Deval et al., 2010).

Chez les mammifères, les différents épissages peuvent donc conduire à l'expression de neuf sous-unités différentes qui sont toutes retrouvées chez l'homme, alors que seules six sont présentes chez les rongeurs. Les différentes sous-unités ont toutes une taille du même ordre de grandeur (chez le rat : ASIC1a = 526 acides aminés ; ASIC1b = 559 acides aminés ; ASIC2a = 512 acides aminés ; ASIC2b = 563 acides aminés ; ASIC3 = 533 acides aminés ; ASIC4 = 539 acides aminés).

Chaque sous-unité est constituée d'une large boucle extracellulaire (7 hélices α et 12 feuillets β) qui représentent plus de 60% de la protéine (Saugstad et al., 2004). Elle relie les deux domaines transmembranaires (TM1 et TM2, 1 hélice α chacun) qui se terminent chacun par une courte partie cytoplasmique (C et N terminales).

Une sous-unité comporte différents domaines structuraux qui schématiquement peuvent faire penser à un avant-bras se terminant par un poing levé enserrant une balle.

Dans cette analogie, l'avant-bras, la main et le poignet représentent respectivement les domaines transmembranaires, la boucle extracellulaire et la jonction entre ces deux parties. La main est constituée des domaines paume, pouce, doigt et articulation, au centre desquels se trouve la β balle [**Figure 18**] (Jasti et al., 2007).

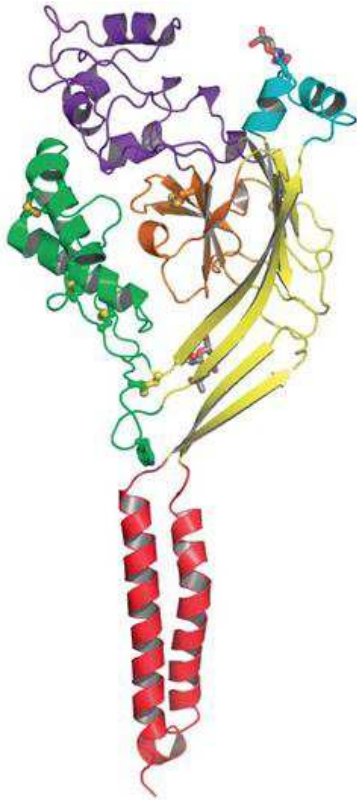
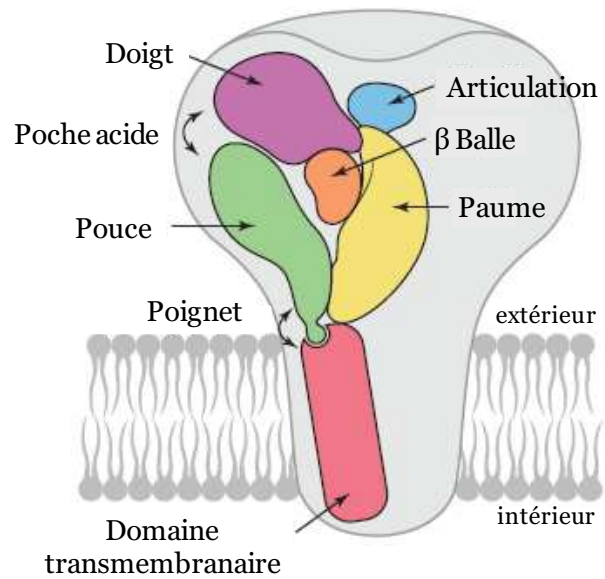
A**B**

Figure 18 : Modélisation de la structure d'une sous-unité ASIC1a.

A. Structure d'une sous-unité ASIC1a, avec les domaines transmembranaires (rouge) et la bouche extracellulaire. Chaque région de la sous-unité est représentée par une couleur différente.

B. Analogie entre la structure du canal et une main enserrant une balle.

(D'après Jasti et al., 2007).

ii. Structure des canaux ASIC

A la fin des années 1990, par homologie avec le canal FaNaC, il a été suggéré que les sous-unités ASIC pourraient s'assembler en tétramère pour former un canal fonctionnel (Coscoy et al., 1998 ; Waldmann et al., 1999). Il a fallu attendre une dizaine d'années et l'apport de la cristallographie pour obtenir de nouvelles informations. Depuis 2007, grâce à la cristallographie du canal ASIC1a de poulet amputé d'une partie des domaines N et C terminaux il est quasi-admis que les canaux ASIC ont une structure trimérique [**Figure 19**] (Jasti et al., 2007).

A l'exception des sous-unités ASIC2b et ASIC4, toutes les autres sous-unités ASIC peuvent s'assembler de manière homomérique ou hétéromérique pour former des canaux fonctionnels trimériques activés par des variations du pH extracellulaire (Bassilana et al., 1997 ; Babinski et al., 2000 ; Baron et al., 2002a ; Benson et al., 2002 ; Askwith et al., 2004 ; Hesselager et al., 2004).

Les multiples combinaisons homomériques et hétéromériques possibles sont à l'origine de la grande diversité des courants ASIC observés dans les neurones et en système hétérologue.

Nous verrons par la suite que chaque canal ainsi formé possède des paramètres de pH dépendance, de cinétiques de courants et de sensibilité pharmacologique qui lui sont propres.

La structure globale du canal ASIC révèle que celui-ci est en forme de calice. Il est constitué d'un large et protubérant domaine extracellulaire, d'une fine partie transmembranaire et d'une partie cytoplasmique qui s'élargie légèrement. Le pore est formé par l'association des trois TM2. A la jonction entre les segments transmembranaires et la boucle extracellulaire, se trouve une partie légèrement évasée, appelée vestibule extracellulaire (Jasti et al., 2007 ; Gonzales et al., 2009 ; Bacongus et Gouaux, 2012 ; Bacongus et al., 2014).

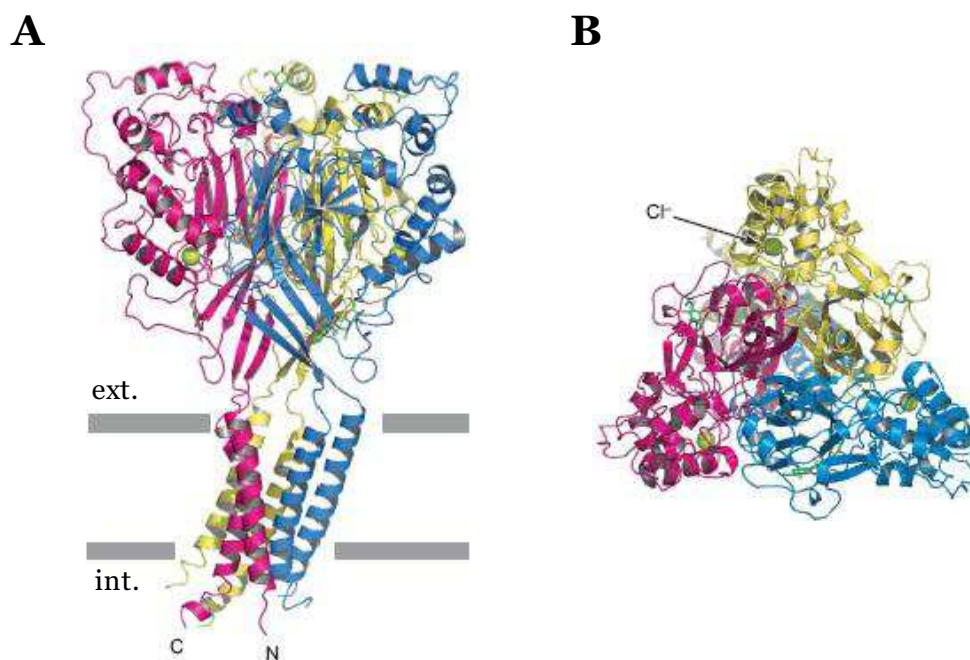


Figure 19 : Modélisation de la structure du canal ASIC1a de poulet.

A. Vue de profil de la structure tridimensionnelle des canaux ASIC1a. Chaque sous-unité est représentée par une couleur (fuchsia / bleu / jaune).

B. Vue du dessus des canaux ASIC1a.

(D'après Jasti et al., 2007).

La structure cristallographique du canal a permis de mettre en évidence trois parties importantes pour son fonctionnement, que sont : la poche acide, le vestibule extracellulaire et le filtre de sélectivité.

Au niveau de la main certains acides aminés clés proches les uns des autres forment une cavité appelée poche acide. Ces acides aminés sont situés au niveau des domaines pouce, doigt et β balle d'une même sous-unité et font des interactions carboxyle-carboxylate avec ceux du domaine paume de la sous-unité adjacente. Cette poche, située à l'interface entre deux sous-unités, est le premier site de fixation des protons.

Le vestibule extracellulaire est une zone légèrement évasée qui va s'élargir lors de l'ouverture du canal. Cette ouverture entraîne l'apparition d'une fenestration à la jonction entre deux sous-unités. On compte donc au total trois fenestrations par canal, par lesquelles vont pouvoir pénétrer les ions sodium hydratés [**Figure 20**].

Au niveau de chaque sous-unité, juste sous le vestibule extracellulaire, au niveau du TM2, on retrouve un motif GAS (Glycine – Alanine – Sérine), hautement conservé, de 3 acides aminés en position 443 à 445. Ce motif forme le filtre de sélectivité ionique (Jasti et al., 2007 ; Gonzales et al., 2009 ; Baconguis et Gouaux, 2012 ; Baconguis et al., 2014). Récemment une étude a remis en cause l'importance du motif GAS dans la sélectivité ionique. Cette sélectivité mettrait préférentiellement en jeu une série de glutamate et d'aspartate situés dans la partie inférieure terminale du pore (Lynagh et al., 2017).

Nous verrons par la suite dans le chapitre : « mécanismes d'activation et d'inactivation » que de nombreux autres acides aminés sont impliqués dans la sensibilité aux protons.

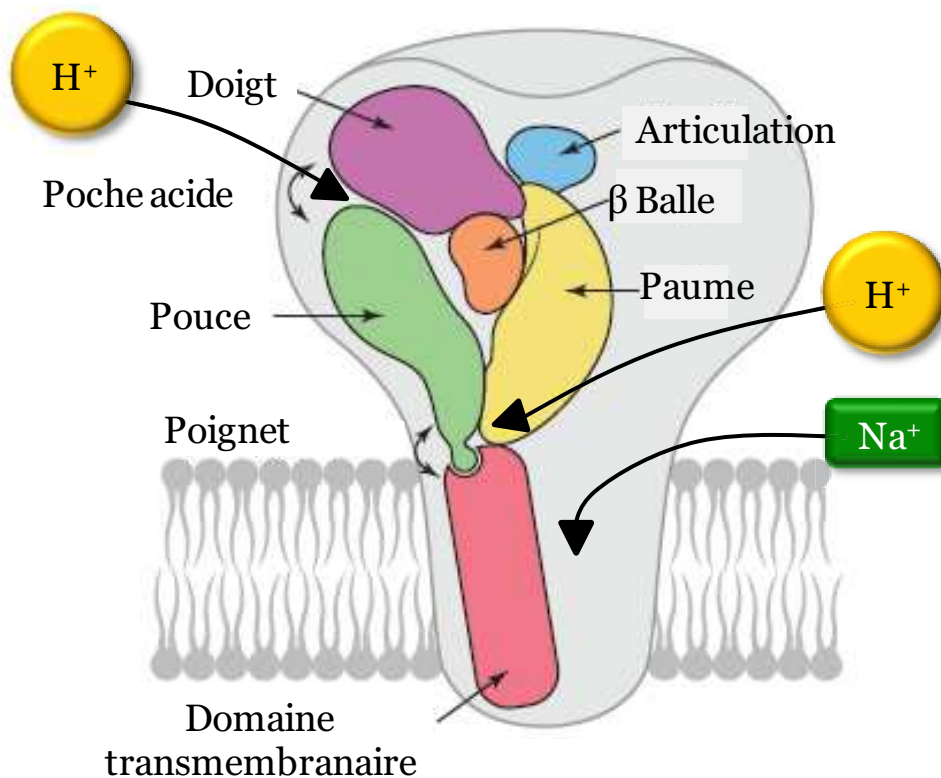


Figure 20 : Sites de fixation des protons et entrée sodique.

Deux sites principaux de fixation des protons ont été identifiés. Les protons peuvent se fixer soit sur la boucle extracellulaire, au niveau de la poche acide, soit à la jonction entre la boucle extracellulaire et les domaines transmembranaires. Le sodium ne pénètre pas par le haut du canal, mais il pénètre par des fenestrations présentes entre chaque sous-unité lors de l'ouverture du canal.

(D'après Jasti et al., 2007).

b. Propriétés biophysiques et fonctionnelles

i. Sélectivité ionique

Les canaux ASIC sont principalement perméables au sodium, ce qui en fait des canaux dépolarisants excitateurs. Outre le sodium, les canaux ASIC et plus particulièrement les canaux ASIC1a homomériques peuvent également avoir une relative perméabilité vis-à-vis d'autres cations (Waldmann et al., 1997a).

Le canal ASIC1a homomérique est aussi perméable au calcium, au potassium, au lithium et même aux protons avec par rapport au sodium les ratios de perméabilité suivants : pNa^+/Ca^{2+} entre 2.5 et 50, pNa^+/K^+ entre 7.8 et 13, pNa^+/Li^+ entre 0.8 et 1.3, pNa^+/H^+ entre 0.2 et 0.8 (Waldmann et al., 1997a ; Bässler et al., 2001 ; Sutherland et al., 2001 ; Yermolaieva et al., 2004 ; Chen et Gründer, 2007). Une publication plus récente a montré que le canal ASIC1a était également perméable aux cations plus volumineux tels que l'ammonium et le guanidinium (Yang et Palmer, 2014).

Les canaux hétéromériques ASIC1a/2a ($pNa^+/Ca^{2+} = 25.5$) et ASIC1a/2b ($pNa^+/Ca^{2+} = 4.1$) présentent une perméabilité calcique similaire à celle de l'homomère ASIC1a (Sherwood et al., 2011).

Les canaux homomériques ASIC1b, ASIC2a et ASIC3 sont moins perméables aux cations, avec une faible perméabilité au potassium (ASIC1b : $pNa^+/K^+ = 14$; ASIC2a : pNa^+/K^+ entre 2.8 et 5.6 ; ASIC3 : $pNa^+/K^+ = 11.5$) et une perméabilité au calcium très faible, voir nulle (Waldmann et al., 1996a ; Waldmann et al 1997b ; Bässler et al., 2001 ; Sutherland et al., 2001).

ii. Mécanismes d'activation et d'inactivation

Activation des canaux ASIC :

Les canaux ASIC ne possèdent pas un site unique de fixation des protons. L'activation de ces canaux par les protons met en jeu de nombreux acides aminés qui ont pu être identifiés grâce à des études de mutagenèse et de cristallographie.

Le premier site senseur du pH extracellulaire est la poche acide qui se situe au niveau de la boucle extracellulaire, assez éloignée des domaines transmembranaires. Cette poche, chargée négativement, contient trois interactions carboxyle-carboxylate entre aspartate et glutamate dont au moins une pourrait être protonée. Elle est hautement conservée dans toutes les sous-unités ASIC (Jasti et al., 2007).

D'après un modèle prédictif, la fixation des protons pourrait engendrer un mouvement des domaines pouce et poignet vers le haut, entraînant un élargissement du vestibule extracellulaire, une rotation des domaines transmembranaires et ainsi l'ouverture du pore du canal (Jasti et al., 2007 ; Gonzales et al., 2009 ; Baconguis et Gouaux, 2012 ; Baconguis et al., 2014).

Outre la poche acide, une région située à la base du domaine paume, constituée de quatre acides aminés (Glu⁶³/His⁷²/His⁷³/Asp⁷⁸), est importante dans la sensibilité aux protons [**Figure 20**] (Baron et al., 2001 ; Paukert et al., 2008). Au niveau de la boucle extracellulaire de nombreux acides aminés contribuent à l'activation des canaux ASIC par les protons (Sherwood et al., 2009 ; Li et al., 2010a ; Liechti et al., 2010 ; Della Vecchia et al., 2013 ; Krauson et al., 2013 ; Ramaswamy et al., 2013 ; Bonifacio et al., 2014).

Inactivation des canaux ASIC :

La transition entre l'état ouvert et l'état inactivé des canaux ASIC se fait par des réarrangements structuraux au niveau de la boucle extracellulaire et des domaines transmembranaires.

Des études combinant mutagenèse et enregistrements électrophysiologiques ont permis de mettre en évidence deux régions (connecteurs $\beta 1 - \beta 2$ et $\beta 11 - \beta 12$) proches des domaines transmembranaires, situées à la base du domaine paume, comme particulièrement importantes pour l'inactivation des canaux ASIC1a (Li et al., 2010b ; Springauf et al., 2011 ; Frey et al., 2013 ; Roy et al., 2013).

Des mutations dans une région proche du TM1 modifient les vitesses d'inactivation des canaux ASIC1 et ASIC3, suggérant un rôle de cette région dans l'inactivation de ces canaux (Coric et al., 2003 ; Cushman et al., 2007). Récemment une étude utilisant des chimères ASIC1a/ASIC2a a montré qu'une région à l'interface du pouce et de la β balle modulait également l'inactivation des canaux ASIC (Krauson et Carattino, 2016).

L'ensemble de ces travaux, ainsi que les co-cristallisations du canal ASIC1a avec la PcTx1 (Psalmotoxine-1) (Baconguis et Gouaux, 2012 ; Dawson et al., 2012) et la MitTx (« *Micrurus tener* toxin ») (Baconguis et al., 2014) ont permis d'éclaircir les mécanismes à l'origine de l'inactivation des canaux ASIC. Ces canaux s'inactivent spontanément suite à de légers mouvements de la boucle extracellulaire et un changement de conformation des domaines transmembranaires, aboutissant à l'obstruction du pore.

De par la combinaison de différentes approches, les mécanismes d'activation et d'inactivation des canaux ASIC sont aujourd'hui mieux compris. Bien que tous les canaux ASIC fonctionnels s'activent et s'inactivent grâce à des mécanismes qui leur sont communs, nous allons voir qu'ils possèdent des propriétés fonctionnelles relativement distinctes.

iii. Diversité des courants

Il existe une grande diversité fonctionnelle de courants ASIC qui résulte de l'assemblage des sous-unités en homomères ou en hétéromères.

Les principaux paramètres biophysiques qui permettent de distinguer les courants ASIC entre eux sont la sensibilité au pH et les cinétiques de courants.

La composition des canaux ASICs modifie de nombreux paramètres, notamment leur sensibilité au pH et leur cinétique de courants.

La sensibilité aux protons :

Bien que tous les canaux ASIC fonctionnels s'activent en réponse à une diminution du pH extracellulaire, ils ne possèdent pas tous la même sensibilité vis-à-vis des protons. Les canaux ASIC1a et ASIC3 homomériques sont les plus sensibles aux variations de pH. De faibles diminutions du pH extracellulaire par rapport au pH physiologique (*i.e.*, pH 7.4) sont suffisantes pour les activer. Les canaux ASIC1a et ASIC3 s'activent respectivement à partir de pH 7.0 et pH 7.2-7.3 (Waldmann et al., 1997a ; Sutherland et al., 2001 ; Yagi et al., 2006). L'activation des canaux ASIC1b et ASIC2a requiert une diminution plus importante du pH. Ces canaux ont des seuils d'activation respectifs proches de pH 6.5 (Chen et al., 1998 ; Babini et al., 2002) et pH 6.0-5.5 (Basilana et al., 1997 ; Lingueglia et al., 1997 ; Champigny et al., 1998).

Outre leur seuil d'activation, les pH de demi-activation ($pH_{0.5}$) des canaux ASIC sont très différents et sont compris dans une gamme allant de pH 6.8 à pH 4.0 (Hesselager et al., 2004 ; Lingueglia et al., 2007). Les pH seuils et les $pH_{0.5}$ des canaux homomériques sont résumés dans le **tableau 3**.

Les canaux hétéromériques ASIC1a+(1b/2a/2b) ont une sensibilité aux protons similaire à celle des canaux homomériques ASIC1a. A contrario, les canaux hétéromériques ASIC1a+3 ont une sensibilité proche de celle d'ASIC3. Les canaux hétéromériques ASIC1b+2a et ASIC1b+3 ont respectivement une pH dépendance proche de celle des canaux ASIC2a et ASIC1b.

La combinaison d'ASIC2b avec ASIC2a ou ASIC3 ne modifie pas la sensibilité aux protons de ces derniers, alors que, combinée avec ASIC1b, elle joue un rôle de dominant négatif rendant l'hétéromère ASIC1b/2b insensible aux protons. Enfin, l'hétéromère ASIC2a+3 possède une sensibilité intermédiaire entre celle des deux canaux homomériques (Hesselager et al., 2004).

Isoforme	pH seuil d'activation	pH demi-activation	τ_{inac} à pH 5.0
rat ASIC1a	7.0	6.2 – 6.8	1560 ms
rat ASIC1b	6.5	5.1 – 6.2	340 ms
rat ASIC2a	5.5 – 6.0	4.1 – 5.0	4700 ms
rat ASIC3	7.2 – 7.3	6.2 – 6.7	240 ms

Tableau 3 : Propriétés électrophysiologiques des canaux ASIC.

(D'après Hesselager et al., 2004 ; Lingueglia et al., 2007).

Les cinétiques de courants :

La diminution du pH extracellulaire entraîne une activation quasi instantanée des canaux ASIC. Cette activation génère un courant transitoire, qui s'inactive plus ou moins rapidement selon les isoformes [**Figure 21**].

Pour comparer les cinétiques d'inactivation, j'utilise ici les constantes de temps d'inactivation (τ_{inac}) à pH 5.0 que j'ai pu mesurer tout au long de ma thèse et qui sont en adéquation avec les valeurs présentes dans la littérature. Si on ne s'intéresse qu'aux canaux homomériques, les canaux qui s'inactivent le plus lentement sont les canaux ASIC2a, avec un τ_{inac} moyen de 4700 ms. Les canaux ASIC1a, ASIC1b et ASIC3 s'inactivent plus rapidement que les canaux ASIC2a avec des τ_{inac} moyens respectifs de 1560, 340 et 240 ms [**Tableau 3**].

Le canal ASIC3 est celui qui s'inactive le plus rapidement. Mais, ce canal présente la particularité de ne pas s'inactiver totalement et d'avoir une cinétique biphasique caractéristique.

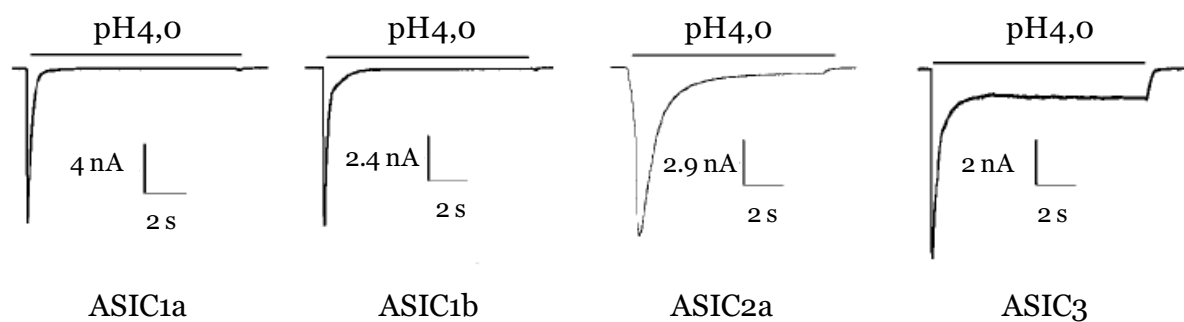


Figure 21 : Cinétiques des courants ASIC homomériques.

En réponse à une acidose extracellulaire à pH 4.0, les canaux ASIC ne s'activent et ne s'inactivent pas tous de la même manière. Les canaux ASIC présentent une inactivation incomplète, aboutissant à un courant soutenu, qui est maintenu tant que perdure l'acidose extracellulaire.

(D'après Hesselager et al., 2004).

En effet, si tous les courants ASIC sont quasi-exclusivement transitoires, ASIC3 présente un courant transitoire parfois suivi d'un courant soutenu qui perdure tant qu'est maintenue l'acidose extracellulaire [**Figure 22A**] (Waldmann et al., 1997b).

Ce courant soutenu n'est pas présent à tous les pH et résulte, selon l'intensité de l'acidification, de deux mécanismes distincts.

Le premier courant soutenu observé (Waldmann et al., 1997b) est retrouvé lors d'une forte acidose (*i.e.*, inférieure à pH 6.0). La présence de ce courant soutenu nécessite au moins le TM1 et la partie N-terminale du canal (Salinas et al., 2009). Une acidose aussi forte, qui pourrait sembler ne pas être physiologique, est pourtant retrouvée dans des conditions pathologiques telles que certains cancers (Mantyh et al., 2002).

L'autre forme de courant soutenu est observée pour des acidoses plus modérées dont les valeurs de pH sont comprises entre 7.3 et 6.5. Cette phase soutenue est due à un courant appelé courant de fenêtre. Il résulte du chevauchement des courbes d'activation et d'inactivation, expliquant la présence d'un courant persistant dans une certaine gamme de pH. Ces courants soutenus persistent tant qu'est maintenue l'acidose extracellulaire [**Figures 22A & 22B**] (Yagi et al., 2006 ; Deval et al., 2008). La composante transitoire des courants ASIC natifs est généralement capable d'engendrer des dépolarisations suffisantes pour générer des PA (Baron et al., 2001 ; Deval et al., 2003). En revanche, la dépolarisation induite par la composante soutenue des courants ASIC3 ne permet pas d'atteindre le seuil de déclenchement des PA dans les neurones DRG de rat. Mais, elle entraîne une dépolarisation constitutive qui sensibilise les neurones vis-à-vis des autres stimuli (Deval et al., 2003 ; Yagi et al., 2006 ; Deval et al., 2008).

Plus récemment il a été montré, au laboratoire, que le canal ASIC3 humain présente une singularité. Une alcalinisation du pH extracellulaire (*i.e.*, pH 8.0) active un courant soutenu. Cette observation suggère que le canal ASIC3 humain serait constitutivement actif à pH physiologique. Grâce à de la mutagénèse, il a pu être montré que deux arginines (R68 et R83) spécifiques du clone humain d'ASIC3 présentent au niveau de la boucle extracellulaire du canal seraient impliquées dans ce phénomène (Delaunay et al., 2012). Le canal ASIC3 humain, en plus de pouvoir répondre aux acidifications extracellulaire par des dépolarisations transitoires comme la majorité des canaux ASIC, pourrait jouer le rôle d'un canal dépolarisant de fond en participant au contrôle du potentiel membranaire de repos des neurones à pH physiologique.

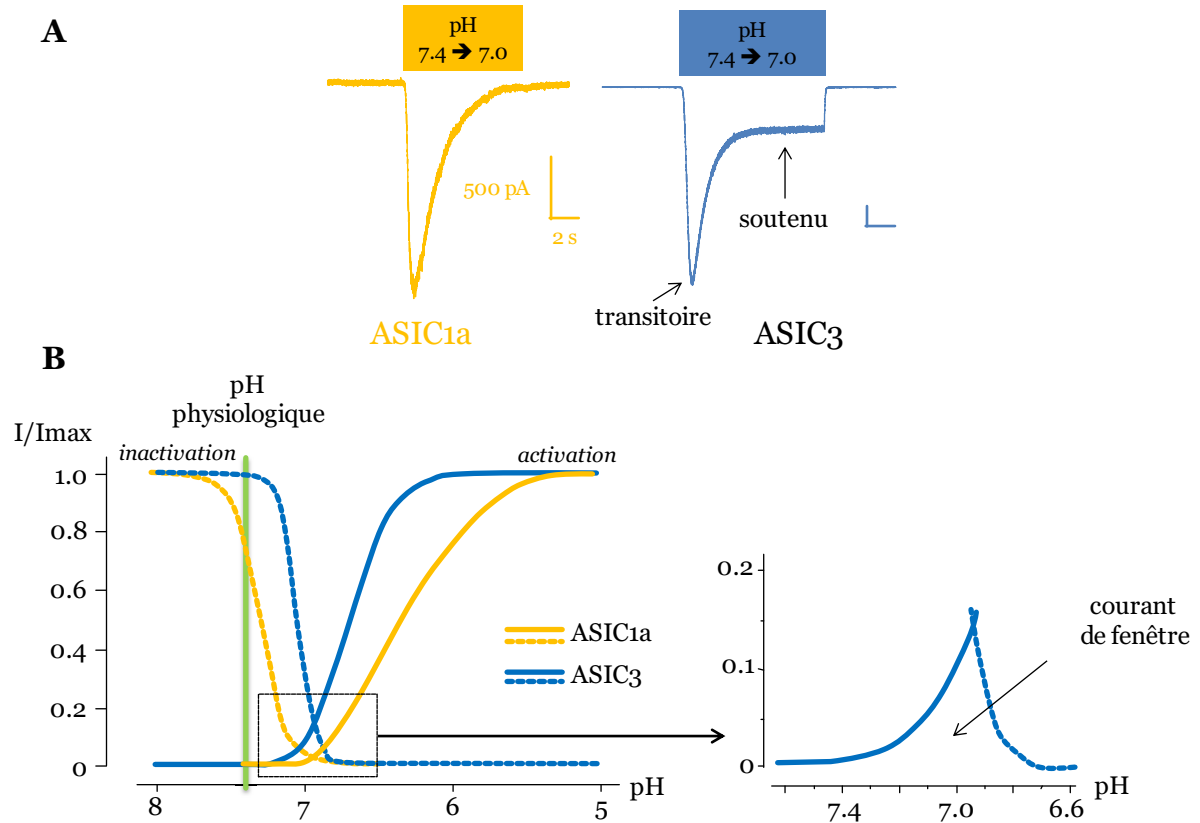


Figure 22 : Courant de fenêtre d'ASIC3.

A. Cinétiques de courants des canaux ASIC1a et ASIC3 homomériques en réponse à une légère acidification (pH 7.0). Les canaux ASIC1a présentent uniquement un courant transitoire, alors que les canaux ASIC3 présentent un courant transitoire suivi d'un courant soutenu. Ce courant soutenu est dû à un courant dit « de fenêtre ».

B. Le courant de fenêtre d'ASIC3 s'explique par le chevauchement des courbes d'activation et d'inactivation.

(D'après Yagi et al., 2006 ; Deval et al., 2008 ; Deval et al., 2010).

3. Pharmacologie et régulation des ASIC

L'expression, l'activité et les propriétés des canaux ASICs peuvent être modulées par : des protéines intracellulaires, des composés exogènes synthétiques (*p. ex.*, des molécules pharmaceutiques) ou naturels (*p. ex.*, des toxines issus de venins d'animaux) et des molécules endogènes (*p. ex.*, des médiateurs inflammatoires).

a. Protéines partenaires

Les canaux ASIC peuvent être régulés par des protéines partenaires intracellulaires avec lesquelles ils s'associent pour former des complexes macromoléculaires. Ces complexes pourraient jouer un rôle dans la mécanosensibilité encore controversée des canaux ASIC. En effet, la stomatine et les « stomatin-like proteins » pourraient conférer aux canaux ASIC une sensibilité mécanique (Price et al., 2004 ; Wetzel et al., 2007).

Les protéines partenaires modifient à la fois l'expression et les propriétés fonctionnelles des canaux ASIC. L'ensemble de ces partenaires et leurs principaux effets rapportés sont résumés dans le **tableau 4** :

Protéines partenaires	Sous-unité(s) ASIC	Sites d'interaction	Régulations	Références
α-actinine	1a	C ter	↗ sensibilité au pH ↘ densité de courant accélère la réactivation	1
Annexine II p11.1	1a	N ter	↗ expression membranaire ↗ densité de courant	2
CIPP	3	C ter	↗ expression membranaire ↗ densité du courant	3 et 4
Lin-7b	3	C ter	↗ expression membranaire ↗ densité du courant	5
MAGI-1b	3	C ter	↗ densité du courant	5
NHERF1	3	C ter	↗ expression membranaire ↗ densité du courant ↗ courant soutenu	4
PIST	3	C ter	↗ densité du courant	5
AKAP150	1a, 2a	C ter	↗ densité du courant	6
PSD-95	2a, 3	C ter	↘ expression membranaire ↘ densité du courant	5, 7 et 8
PICK1	1a, 2a, 2b	C ter	↗ expression ASIC1a Médiateur des effets de la PKC sur ASIC2a et l'hétéromère ASIC3+2b	9 , 10, 11, 12 et 13
Stomatine	1a, 2a, 3	?	accélère inactivation ASIC2a ↘ densité du courant ASIC3	14
« Stomatin-like proteins »	1a, 2a, 3	?	Inhibition courants ASIC1a, ASIC2a et ASIC3	15, 16 et 17

Tableau 4 : Partenaires protéiques intracellulaires des canaux ASIC.

Références : (1) : Schnizler et al., 2009 ; (2) : Donier et al., 2005 ; (3) : Anzai et al., 2002 ; (4) : Deval et al., 2006 ; (5) : Hruska-Hageman et al., 2004 ; (6) : Chai et al., 2007 ; (7) : Eshcol et al., 2008 ; (8) : Zha et al., 2009 ; (9) : Duggan et al., 2002 ; (10) : Hruska-Hageman et al., 2002 ; (11) : Baron et al., 2002b ; (12) : Leonard et al., 2003 ; (13) : Deval et al., 2004 ; (14) : Price et al., 2004 ; (15) : Wetzel et al., 2007 ; (16) : Lapatsina et al., 2012 ; (17) : Kozlenkov et al., 2014.

Nous allons voir dans les trois chapitres suivants qu'outre la modulation par des protéines intracellulaires, de nombreux composés, lorsqu'ils sont appliqués du côté extracellulaire, peuvent moduler l'activité des canaux ASIC.

b. Modulateurs exogènes synthétiques

Depuis la découverte des ASIC, de nombreuses molécules synthétiques ont été montrées comme ayant des effets sur ces canaux. La grande majorité de ces composés ont un effet inhibiteur, alors qu'un seul possède un effet purement activateur.

Dans ce chapitre, parmi les nombreux modulateurs des canaux ASIC décrits à ce jour, j'ai choisi de développer les plus courants, mais l'ensemble des composés synthétiques qui agissent sur les ASIC sont regroupés dans le **tableau 5**.

L'amiloride

L'amiloride, un diurétique utilisé notamment pour traiter les cas d'hypertension, est le premier inhibiteur des canaux ASIC à avoir été mis en évidence. Il a d'abord été montré comme inhibiteur du « récepteur des protons » (Korkushko et Kryshtal, 1984) puis, comme inhibiteur des canaux ASIC (Price et al., 1996 ; Waldmann et al., 1996a). L'amiloride est un bloqueur non discriminant des canaux ASIC, avec une IC₅₀ (concentration inhibant 50% de l'effet observé) comprise entre 5 et 100 μ M (Price et al., 1996 ; Waldmann et al., 1996a ; Waldmann et al., 1997a ; Waldmann et al., 1997b ; Chen et al., 1998). Mais son effet n'est pas spécifique des canaux ASIC, il peut également bloquer d'autres canaux et échangeurs sodiques (Frelin et al., 1988 ; Kleyman et Cragoe, 1988). Sur les canaux ASIC, l'amiloride a un effet pore bloqueur, empêchant le passage du sodium à travers le pore du canal [**Figure 23**] (Schild et al., 1997 ; Baconguis et al., 2014).

L'amiloride possède un effet paradoxal sur les canaux ASIC. En plus de son effet inhibiteur, il est capable, lorsqu'il est appliqué à de fortes concentrations (*i.e.*, plusieurs centaines de micromolaires), d'activer les canaux ASIC₃ homomériques à pH physiologique et de potentialiser les effets d'une acidification modérée sur ces mêmes canaux (Waldmann et al., 1997b ; Adams et al., 1999 ; Yagi et al., 2006).

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

L'équipe du Pr Lazdunski a montré, à l'IPMC, que les AINS étaient capables d'inhiber l'activité d'ASIC1a et d'ASIC3. Les canaux homomériques ASIC1a sont bloqués par deux AINS, le flurbiprofène et l'ibuprofène ($IC_{50} \approx 350 \mu M$). Les canaux ASIC3 sont eux bloqués par l'acide salicylique, l'aspirine et le diclofénac avec des IC_{50} comprises entre 90 et 260 μM . Ces concentrations, bien qu'élevées, sont du même ordre de grandeur que celles utilisées en thérapeutique humaine (Voilley et al., 2001). Plus récemment il a été montré que le diclofénac pouvait également bloquer les canaux ASIC2a, mais à des concentrations plus élevées ($IC_{50} \approx 500 \mu M$) (Dorofeeva et al., 2008).

Le GMQ (2-guanidine-4-méthylquinazoline)

Contrairement aux molécules précédentes, qui ont majoritairement un effet inhibiteur, le GMQ est lui un activateur spécifique des canaux ASIC3.

Le GMQ est un composé synthétique qui est capable, à de fortes concentrations, d'activer à pH physiologique les canaux ASIC3 homomériques de manière persistante. Son EC_{50} (concentration aboutissant à 50% de l'effet maximal) à pH 7.4 est d'environ 1 mM. À de plus faibles concentrations, de l'ordre de la dizaine de micromolaires, le GMQ potentialise le courant ASIC3 induit par une acidification modérée. De façon intéressante, le site de fixation du GMQ n'est pas un des sites de fixation des protons. La mutation des paires carboxyle-carboxylate de la poche acide décrite précédemment n'affecte pas la liaison du GMQ (Yu et al., 2010).

Ce composé a permis la découverte d'un nouveau site de fixation, nommé site « non-proton dépendant » [**Figure 23**]. Il se situe à l'interface des 3 sous-unités au niveau des domaines paume (Yu et al., 2011). Le GMQ entraîne un décalage de la courbe d'activation vers des pH plus alcalins, conduisant à une augmentation du courant de fenêtre et donc à une activation à pH physiologique (Alijevic et Kellenberger, 2012).

Modulateurs synthétiques	Classe pharmacologique	Concentration effective	Canaux ASIC impliqués
Amiloride	Diurétique	IC ₅₀ ≈ 5 - 100 μM EC ₅₀ ≈ 560 μM	Tous ASIC ₃ , ASIC ₃ +1b
GMQ	Dérivé de l'amiloride	EC ₅₀ ≈ 1 mM	ASIC ₃
Flurbiprofène Ibuprofène	AINS	IC ₅₀ ≈ 350 μM	ASIC _{1a}
Acide salicylique Aspirine Diclofénac	AINS	IC ₅₀ ≈ 90 - 260 μM	ASIC ₃ ASIC _{2a}
CHF5074	Dérivé d'AINS	IC ₅₀ ≈ 50 nM	Canaux natifs des neurones de l'hippocampe
Tétraéthylammonium (TEA)	Inhibiteur des canaux Kv	De l'ordre du mM	ASIC _{1a} +2a/2b
4-aminopyridine (4-AP)	Inhibiteur des canaux Kv	IC ₅₀ ≈ 760 μM	Tous sauf ASIC ₃
Tétracaïne	Anesthésique local	IC ₅₀ ≈ 10 mM	ASIC _{1b} , ASIC ₃
Lidocaïne	Anesthésique local	IC ₅₀ ≈ 12 mM	ASIC _{1a}
Propofol	Anesthésique	IC ₅₀ ≈ 30 - 300 μM	ASIC _{1a} , ASIC ₃
A-317567	Amidine	IC ₅₀ ≈ 2 - 30 μM	ASIC ₃
Benzothiophène méthyle amine	-	IC ₅₀ ≈ 0.22 μM	ASIC _{1a} , ASIC ₃
Streptomycine Néomycine	Antibiotiques, aminosides	IC ₅₀ ≈ 32 - 44 μM	Canaux natifs de neurones DRG
Mésylate de nafamostat	Anticoagulant	IC ₅₀ ≈ 2 - 70 μM	Tous
Dyarilamidines	Parasiticide	IC ₅₀ ≈ 0.3 - 38 μM	Tous
Chloroquine	Antipaludique	IC ₅₀ ≈ 600 μM	ASIC _{1a}

Tableau 5 : Modulateurs exogènes synthétiques des canaux ASIC.

(D'après Baron et Lingueglia, 2015 ; Lingueglia et Lazdunski, 2015).

c. Modulateurs exogènes naturels

La nature offre de nombreux composés émanant des animaux et des végétaux, qui sont capables de moduler l'activité des canaux ioniques, notamment des canaux ASIC. Les principaux modulateurs naturels des canaux ASIC étant issus des venins animaux, dans ce chapitre je ne développe que ces molécules. A ce jour, il existe dix modulateurs naturels des canaux ASIC issus des venins de trois groupes d'animaux, que sont les anémones de mer, les araignées et les serpents.

La PcTx1 (Psalmotoxine-1)

La PcTx1 provient du venin de l'araignée *Psalmopeus cambridgei* (ou mygale à chevrons). Elle est la première toxine modulatrice des canaux ASIC à avoir été isolée, à l'IPMC (Escoubas et al., 2000). C'est un peptide de 40 acides aminés, inhibiteur des canaux homomériques ASIC1a ($IC_{50} \approx 1$ à 3 nM, isoformes de rats et humaines), hétéromériques ASIC1a+2b ($IC_{50} \approx 3$ nM, isoforme de souris) et ASIC1a+2a (inhibition de 35 à 85% du courant à 50 nM, isoforme de rats) (Sherwood et al., 2011 ; Joeres et al., 2016). À des concentrations plus élevées ($EC_{50} \approx 100$ nM), la PcTx1 potentialise l'activité des canaux ASIC1b (Chen et al., 2006b).

D'abord grâce à des études de mutagenèse puis grâce à l'apport de la cristallographie, il a pu être montré que la PcTx1 agissait en se fixant au niveau de la poche acide [**Figure 23**] (Salinas et al., 2006 ; Baconguis et Gouaux, 2012). Elle agit en augmentant l'affinité apparente du canal pour les protons, ce qui le rend inactivé à pH physiologique et stabilise le canal dans cette conformation inactivée (Chen et al., 2005 ; Salinas et al., 2006 ; Qadri et al., 2009).

L'injection de la PcTx1 au niveau du système nerveux central par voies *it* (intrathécale) ou *icv* (intracérébroventriculaire) induit une analgésie chez les rongeurs (Duan et al., 2007 ; Mazzuca et al., 2007).

Récemment un peptide de 37 résidus, ayant une homologie de 82% avec la PcTx1, le Hm3a a été isolé à partir de l'araignée *Heteroscodra maculata*. Comme la PcTx1, ce peptide bloque les canaux recombinants ASIC1a de rats avec une affinité similaire ($IC_{50} \approx 1$ à 2 nM) et potentialise les canaux de rats ASIC1b ($EC_{50} \approx 46.5$ nM) et ASIC1a+1b ($EC_{50} \approx 17.4$ nM).

Le Hm3a a les mêmes effets sur les isoformes humaines mais avec une affinité moindre que celle pour les isoformes de rat. Le Hm3a décale les courbes d'activation et d'inactivation vers des pH plus alcalins, ce qui a pour conséquence de stabiliser les canaux ASIC à l'état inactivé, comme la PcTx1 (Er et al., 2017).

L'APETx2 (*Anthopleura elegantissima* toxine 2)

La toxine APETx2 est une toxine de 42 acides aminés isolée à l'IPMC à partir de l'anémone de mer *Anthopleura elegantissima*. C'est la première toxine inhibitrice des canaux ASIC3 homomériques et hétéromériques à avoir été identifiée (Diochot et al., 2004). Cette toxine inhibe les canaux recombinants ASIC3 de rats et humains avec une IC₅₀ d'environ 37 à 63nM pour l'isoforme de rats et 175 nM pour l'isoforme humaine. Pour les canaux hétéromériques ASIC1a+3, ASIC1b+3 et ASIC2b+3, l'IC₅₀ est comprise entre 0.1 et 2 µM (Diochot et al., 2004).

L'APETx2 est capable d'inhiber le courant transitoire et environ 50% du courant soutenu de fenêtre à pH 7.0 des canaux homomériques (Deval et al., 2011). Elle inhibe également le courant activé par des pH alcalins, caractéristique du canal ASIC3 humain (Delaunay et al., 2012). A contrario le courant soutenu induit par une forte acidification n'est lui pas inhibé par cette toxine (Diochot et al., 2004).

A ce jour, le mécanisme d'action et le site de fixation d'APETx2 ne sont pas encore élucidés. Toutefois une étude utilisant une simulation informatique d'amarrage (« docking ») a permis d'émettre deux hypothèses concernant le site de fixation d'APETx2 sur le canal ASIC3. Cette toxine pourrait se lier au niveau de la partie haute du domaine pouce ou au niveau du vestibule extracellulaire juste au-dessus des domaines transmembranaires [**Figure 23**] (Rahman et Smith, 2014).

L'injection d'APETx2 en périphérie chez le rongeur, a permis de montrer l'implication des canaux ASIC3 dans la perception de diverses douleurs, notamment inflammatoires (Deval et al., 2008), musculaires (Karczewski et al., 2010), post-opératoires (Deval et al., 2011) et articulaires (Izumi et al., 2012 ; Sugimura et al., 2015).

La toxine APETx2 n'est pas un bloqueur spécifique des canaux ASIC3.

Elle est aussi capable d'inhiber les canaux Na_v1.8 qui sont également impliqués dans les processus douloureux au niveau du système nerveux périphérique (Blanchard et al., 2012 ; Peigneur et al., 2012), ainsi que d'autres canaux de la famille des Na_v (Peigneur et al., 2012) et les canaux cardiaques hERG (Jensen et al., 2014). Du fait du double effet sur les canaux ASIC3 et Na_v1.8, l'APETx2 pourrait être un bon candidat d'un point de vue thérapeutique pour soulager la douleur.

Comme pour PcTx1, la toxine APETx2 possède un homologue, la toxine Hcr 1b-1 (ou π -AnmTX Hcr 1b-1) qui provient d'une autre anémone de mer (*Heteractis crispa*) et qui présente 51% d'homologie avec la toxine APETx2. Mais, cette toxine n'est que très peu utilisée car elle est environ 35 fois moins efficace que la toxine APETx2 (Kozlov et al., 2012).

La MitTx (*Micrurus tener* toxine)

La morsure du serpent corail (*Micrurus tener tener*) provoque de fortes douleurs persistantes. C'est en 2011 que l'étude du venin de ce serpent a permis d'identifier la MitTx, une toxine constituée d'une sous-unité α (60 acides aminés) et d'une sous-unité β (120 acides aminés). Cette toxine est, contrairement aux toxines précédemment citées, une toxine activatrice des canaux homomériques ASIC1a (EC₅₀ \approx 9 nM) et ASIC1b (EC₅₀ \approx 23 nM) à pH physiologique. Elle présente une efficacité au moins aussi forte que celle d'un pH acide et induit un courant persistant et robuste. Outre son effet activateur, la MitTx est capable de potentialiser plus de 100 fois le courant ASIC2a induit par une acidification extracellulaire (Bohlen et al., 2011).

L'utilisation de la MitTx et sa co-cristallisation avec le canal ASIC1a ont permis de mettre en évidence la structure du canal ASIC1a à l'état ouvert. Cette étude a aussi permis de démontrer que la MitTx se fixe sur une seule sous-unité, contrairement à la PcTx1. La MitTx se fixe sur toute la longueur du pouce et du domaine poignet jusqu'au domaine articulation [**Figure 23**] (Bacongus et al., 2014). La MitTx chevauche en partie le site de fixation de la PcTx1, ce qui explique que leurs effets soient mutuellement exclusifs (Bohlen et al., 2011 ; Bacongus et al., 2014).

L'injection intraplantaire de MitTx induit chez la souris un comportement douloureux qui est abolit chez les souris invalidées pour les canaux ASIC1a mais pas chez les souris invalidées pour les canaux ASIC3 (Bohlen et al., 2011), confirmant, *in vivo*, la sélectivité de cette toxine.

Les Mambalgines

Au nombre de trois, les mambalgines (mambalgine 1, 2 et 3) sont des peptides de 57 acides aminés isolés à partir du venin de deux serpents mamba. Les mambalgines 1 et 2 proviennent du mamba noir (*Dendroaspis polylepis*), alors que la mambalgine 3 provient du mamba vert (*Dendroaspis angusticeps*) (Diochot et al., 2012).

Elles appartiennent à la famille des toxines à trois doigts et ne diffèrent chacune que par un seul acide aminé. Les mambalgines inhibent les canaux homomériques ASIC1a ($IC_{50} \approx 11$ à 55 nM pour les ASIC1a de rats et $IC_{50} \approx 127$ nM pour les ASIC1a humains) et ASIC1b ($IC_{50} \approx 44$ à 192 nM pour les ASIC1b de rat), ainsi que les canaux hétéromériques contenant les sous-unités ASIC1a ou ASIC1b ($IC_{50} \approx 61$ à 252 nM pour les ASIC de rat) (Diochot et al., 2012 ; Baron et al., 2013).

À ce jour il n'existe pas de co-cristallisation des mambalgines avec les canaux ASIC, mais grâce à des études de mutagénèse et de simulation informatique, un modèle d'amarrage de la mambalgine 2 sur les canaux ASIC1a a été proposé. La mambalgine se fixerait au niveau de la partie haute du pouce et de la β balle d'une sous-unité, ainsi que sur le domaine paume de la sous-unité adjacente. Il y aurait donc un chevauchement de la poche acide, figeant ainsi le canal dans l'état fermé suite à un décalage de la courbe d'activation vers des pH plus acides [**Figure 23**].

Cette étude a également permis de mettre en évidence un possible effet stimulateur de la mambalgine. En effet, l'ajout du domaine pouce du canal ASIC1a sur le canal ASIC2a (insensible à la mambalgine) produit un effet stimulateur. A contrario si on ajoute le domaine pouce du canal ASIC2a sur le canal ASIC1a, la mambalgine ne peut plus se lier sur le canal, cette dernière n'a donc plus d'effet (Salinas et al., 2014).

La mambalgine est donc intéressante pour la cristallographie, car grâce à la PcTx1 et la MitTx nous disposons déjà des structures des canaux ASIC à l'état inactivé et ouvert mais pas à l'état fermé. La co-cristallisation avec la mambalgine permettrait d'obtenir la structure des canaux ASIC à l'état fermé.

La mambalgine 1 est capable d'induire une analgésie chez la souris lorsqu'elle est injectée au niveau central (*i.e.*, voie *it*) et au niveau périphérique (*i.e.*, voie intraplantaire), mettant respectivement en jeu les canaux natifs ASIC1a et ASIC1b (Diochot et al., 2012). L'injection systémique (*i.e.*, voie *iv*) de mambalgine induit également une analgésie (Diochot et al., 2016). Les mambalgines ont un effet analgésique dans des modèles de douleurs aiguë et inflammatoire (Diochot et al., 2012), ainsi que dans les hyperalgies mécaniques et thermiques inflammatoires et neuropathiques (Diochot et al., 2016).

C'est un des composés les plus prometteurs de par ces effets proches de ceux de la morphine avec néanmoins moins d'effets secondaires (Diochot et al., 2012 ; 2016).

L'Ugr9-1 (*Urticina grebelnyi* 9-1)

La toxine Ugr9-1 (ou π -Anm Tx Ugr9a-1) est un peptide de 29 acides aminés, isolé à partir du venin de l'anémone de mer de Noël (*Urticina grebelnyi*). Cette toxine qui semble spécifique des canaux ASIC3, bloque complètement le courant transitoire ($IC_{50} \approx 10 \mu M$) et jusqu'à 50% du courant soutenu ($IC_{50} \approx 1.4 \mu M$) des canaux ASIC3 humains homomériques (Osmakov et al., 2013). À ce jour, le site de fixation et le mécanisme d'inhibition des canaux ASIC3 par cette toxine n'est pas élucidé.

Chez la souris, l'injection par voie *iv* ou *ip* d'Ugr9-1 diminue respectivement l'hyperalgie thermique dans un modèle de douleur inflammatoire et le comportement douloureux induit par une injection d'acide acétique (Osmakov et al., 2013).

La PhcrTx1 (*Phymanthus crucifer* toxine 1)

La PhcrTx1 (ou π -PMTX-Pcf1a) est un peptide de 32 acides aminés, qui est également produit par une anémone de mer, l'anémone à chapelets (*Phymanthus crucifer*). Ce peptide, lorsqu'il est appliqué à $10 \mu M$ avant la stimulation acide (pH 6.1), bloque jusqu'à 48.5% du courant ASIC natif transitoire dans les neurones DRG de rats ($IC_{50} \approx 100 \text{ nM}$). Ce peptide inhibe partiellement les courants Kv des neurones DRG, mais avec une moins bonne affinité que pour les canaux ASIC (16% d'inhibition à $30 \mu M$) (Rodriguez et al., 2014).

L'α-dendrotoxine

L'α-dendrotoxine est, comme la mambalgine 3, issue du venin du mamba vert. C'est un peptide de 59 acides aminés qui est déjà connu pour être un bloqueur de certains canaux Kv. Bien que cette toxine ne partage que 55% d'homologie avec la sous-unité α de la MitTx, elle partage 4 des 6 sites de fixation de cette dernière identifiés lors de la cristallisation. Ces observations suggèrent que le site de fixation de l'α-dendrotoxine pourrait être similaire à celui de la MitTx. Cette toxine inhibe les courants ASIC natifs transitoires dans les neurones DRG de rats ($IC_{50} \approx 800 \text{ nM}$) lorsqu'elle est appliquée avant la stimulation acide. Si elle est co-appliquée avec une solution acide (pH 6.1), elle ne produit aucun effet, suggérant qu'elle se lierait préférentiellement sur le canal à l'état fermé (Baez et al., 2015). A ce jour son mécanisme d'action, son site de fixation et son affinité pour les différentes sous-unités ASIC ne sont pas connus.

La Hi1a (*Hadronyche infensa* 1a)

En 2017, une nouvelle toxine inhibitrice des canaux ASIC1a a été découverte. Cette toxine nommée Hi1a provient de l'araignée à toile-entonnoir (*Hadronyche infensa*). Contrairement à la toxine PcTx1, qui est composée d'un seul domaine ICK (« inhibitor cystine knot »), ce peptide de 75 acides aminés est composé de deux domaines ICK reliés entre eux. Chacun des domaines présentent 62% et 50% d'homologie avec la PcTx1. La Hi1a inhibe spécifiquement jusqu'à 80% des courants de rats et humains ASIC1a homomériques (IC_{50} respectives $\approx 400 \text{ pM}$ et 520 pM). Malgré sa ressemblance avec PcTx1, contrairement à cette dernière les effets de la Hi1a sont très difficilement réversibles. En effet au bout de 30 minutes de lavage, l'effet inhibiteur est toujours présent à hauteur de 60% de l'inhibition maximale. Cette toxine induit un délai avant l'activation, elle se lierait et stabiliserait l'état fermé (la PcTx1 se lie à l'état inactivé). Enfin, les auteurs ont pu mettre en évidence que le site de fixation de la Hi1a chevauche au moins en partie celui de la PcTx1 (Chassagnon et al., 2017).

Parmi les différents modulateurs des canaux ASIC, les toxines issues des venins d'animaux présentent un intérêt majeur pour trouver des inhibiteurs ou des activateurs de ces canaux. Il existe une très grande diversité d'animaux venimeux et chaque venin peut renfermer des milliers de molécules. Ainsi, il reste encore à étudier de très nombreux venins d'animaux qui pourraient renfermer des composés actifs sur les canaux ASIC.

L'intérêt de ces recherches est double. Elles permettent soit d'essayer de trouver les toxines les plus spécifiques pour chaque sous-type de canal et ayant la meilleure affinité possible, soit de trouver une toxine qui inhiberait plusieurs famille de canaux ioniques impliquées dans la douleur. Celle-ci aurait alors un fort potentiel thérapeutique.

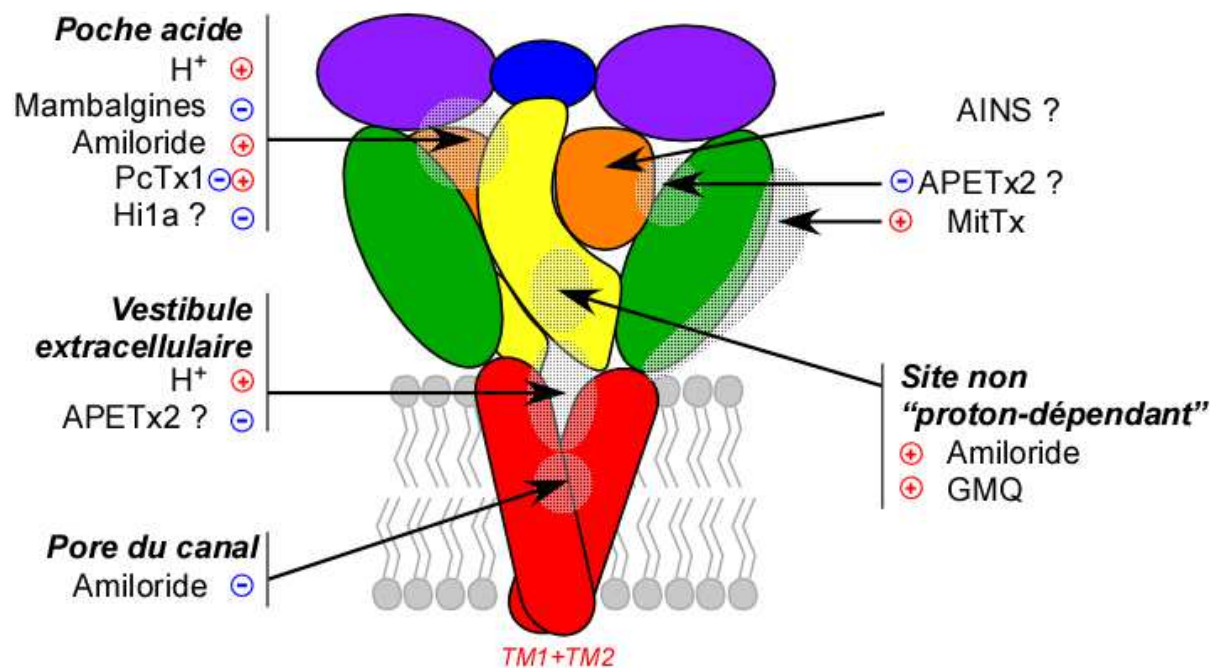


Figure 23 : Sites de fixation et effets des principaux modulateurs des canaux ASIC.

Les principaux modulateurs des canaux ASIC peuvent agir au niveau de différentes régions clés telles que la poche acide, le pore du canal, le vestibule extracellulaire ou le site non « proton-dépendant ». Leur rôle est de favoriser ou au contraire d'inhiber l'activité des canaux ASIC.

(D'après Baron et Lingueglia, 2015).

d. Modulateurs endogènes

Les canaux ASIC ne sont pas uniquement sensibles à des molécules exogènes, leur activité peut également être modulée par de nombreux composés endogènes.

Les cations métalliques

Les cations métalliques font partis des plus anciens modulateurs endogènes des canaux ASIC à avoir été étudié. Les canaux ASIC natifs ou recombinants sont inhibés par différents ions provenant de métaux lourds.

Le gadolinium (Gd^{3+}) à 100 μM est un inhibiteur des canaux hétéromériques ASIC2a+3 de rats et humains (Babinski et al., 2000), ainsi que des courants ASIC dans les cellules de Purkinje de rats (Allen et Attwell, 2002).

Le plomb (Pb^{2+}) est capable d'inhiber les courants ASIC des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière et des neurones de la région CA1 de l'hippocampe (IC_{50} entre 7 et 9 μM). De plus, il inhibe les courants des canaux homomériques ASIC1a ($IC_{50} \approx 3.7 \mu M$) et ASIC1b ($IC_{50} \approx 1.5 \mu M$) et des canaux hétéromériques ASIC1a+2a ($IC_{50} \approx 4.9 \mu M$) et ASIC1a+2b ($IC_{50} \approx 2.8 \mu M$). Enfin à de fortes concentrations (100 μM) le plomb inhibe 35% du courant ASIC3 (Wang et al., 2006). Le cuivre (Cu^{2+}) inhibe les courants ASIC des neurones centraux hypothalamiques ($IC_{50} \approx 46.8 \mu M$), hippocampiques et corticaux (Wang et al., 2007).

Enfin, le cadmium (Cd^{2+}) inhibe les canaux ASIC2a ($IC_{50} \approx 1 \text{ mM}$, inhibition maximale à 40%), 3, 1a+2a, 1a+3, 2a+3, alors que le nickel (Ni^{2+}) inhibe les canaux ASIC1a ($IC_{50} \approx 580 \mu M$, inhibition maximale à 60%) et 1a+2a. Le nickel inhibe également les courants ASIC dans les neurones de la région CA1 de l'hippocampe ($IC_{50} \approx 1.6 \text{ mM}$, inhibition maximale à 60%) (Staruschenko et al., 2007).

Les cations divalents

Parmi tous les cations divalents, le calcium (Ca^{2+}), le magnésium (Mg^{2+}) et le zinc (Zn^{2+}) ont été identifiés comme modulateurs des canaux ASIC.

Le calcium est sans aucun doute le cation modulateur des canaux ASIC le plus connu.

Avant même le clonage des canaux ASIC, le calcium avait été identifié comme un inhibiteur des courants sodiques activés par les protons dans les neurones DRG de poussin (Davies et al., 1988). Une augmentation de la concentration du calcium extracellulaire (de 0.1 à 10 mM) diminue : (i) la perméation sodique des canaux ASIC (Waldmann et al., 1997a), (ii) la conductance unitaire des canaux ASIC1a, 2a et 3 (De Weille et Bassilana, 2001 ; Immke et McCleskey, 2003) et (iii) l'amplitude des courants ASIC1a, 1b et 3 (De Weille et Bassilana, 2001 ; Sutherland et al., 2001 ; Paukert et al., 2004).

Le calcium peut avoir un effet potentialisateur sur les canaux ASIC1a s'il est appliqué à une concentration inférieure à 5 mM pendant le pH de conditionnement (De Weille et Bassilana, 2001). A 10 mM les courants ASIC1a, 1b, 3 recombinants de rats, ainsi que les courants ASIC natifs des afférences cardiaques sont respectivement inhibés de 82%, 83%, 34 % et 44% (Sutherland et al., 2001).

Le calcium modifie la dépendance aux protons des canaux ASIC en décalant les courbes d'activation vers des pH plus acides. Ces résultats suggèrent une compétition entre le calcium et les protons au niveau d'un site commun de fixation (Babini et al., 2002 ; Immke et McCleskey, 2003). En réalité, il existerait deux sites de fixation.

A l'état fermé, le calcium peut se lier au niveau de la poche acide. Lors d'une acidification, la fixation des protons diminue l'affinité pour le calcium, entraînant un déplacement de ce dernier (Jasti et al., 2007 ; Paukert et al., 2008).

Un deuxième site de fixation, dit de haute affinité, a été mis en évidence d'abord sur les canaux ASIC3 puis sur les canaux ASIC1. Lors d'une acidification, les protons permettraient de lever ce « bloc calcique » (Immke et McCleskey, 2003). Ce site a été localisé sur le canal ASIC1a, du côté extracellulaire au début du TM2 et mettrait en jeu deux acides aminés clés (E426 et D433). Au niveau de ce site, le calcium inhiberait à l'état ouvert, l'activité des canaux ASIC1a et ASIC1b (Paukert et al., 2004).

Le magnésium produit des effets similaires à ceux du calcium (Babini et al., 2002).

Le zinc possède un double effet qui est concentration dépendant. A de faibles concentrations de l'ordre du nanomolaire, le zinc est un inhibiteur de haute affinité des canaux homomériques ASIC1a, hétéromériques ASIC1a+2a et des courants ASIC de neurones corticaux de souris (IC₅₀ comprise entre 7 et 14 nM) (Chu et al., 2004).

A contrario à de plus fortes concentrations, de l'ordre de la centaine de micromolaires, le zinc est un potentialisateur de faible affinité des canaux contenant la sous-unité ASIC2a ($EC_{50} \approx 120 \mu M$) (Baron et al., 2001) et un inhibiteur des canaux ASIC3 (à $300 \mu M$) (Poirot et al., 2006). Bien que sa concentration ne soit pas connue au niveau de la fente synaptique, le zinc libéré au niveau de celle-ci pourrait moduler l'activité des canaux ASIC et l'excitabilité neuronale en conditions physiologiques et pathologiques (Choi et al., 1988 ; Chu et al., 2004).

Les neuropeptides

Nous avons vu précédemment que dans la grande famille des canaux ENaC/DEG, le canal FaNaC était activé par un neuropeptide le FMRFamide (Lingueglia et al., 1995). Du fait de leur appartenance à cette grande famille, les effets du FMRFamide, ainsi que ceux d'autres neuropeptides ayant le motif RFamide, ont été testés sur les canaux ASIC. Les quatre principaux peptides étudiés sont le FMRFamide (spécifique des invertébrés), le FRRFamide, le neuropeptide FF (NPFF, FLFQPQRFamide) et le neuropeptide SF (NPSF, SLAAPQRFamide). Les deux derniers sont exprimés au niveau de la moelle épinière et des DRG chez les mammifères (Allard et al., 1999 ; Vilim et al., 1999).

Les neuropeptides ne sont pas capables d'activer directement les canaux ASIC recombinants. En revanche, ils potentialisent les courants ASIC induits par une diminution du pH (EC_{50} comprise entre 10 et $50 \mu M$). Ils engendrent notamment une augmentation du courant soutenu et/ou un ralentissement de l'inactivation des canaux homomériques ASIC1a, 1b, 3 et des canaux hétéromériques ASIC1a+3, 1b+3, 2a+3 de rongeurs et humains, ainsi qu'un décalage des courbes d'inactivation vers des pH plus acides (Askwith et al., 2000 ; Catarsi et al., 2001 ; Deval et al., 2003 ; Chen et al., 2006a ; Sherwood et Askwith, 2008). Parmi tous les canaux ASICs sensibles aux neuropeptides, le canal ASIC3 est le plus sensible (Lingueglia et al., 2006). L'expression des ASIC, ainsi que celle du précurseur du NPFF sont augmentées au niveau des nocicepteurs et de la moelle épinière en cas d'inflammation, suggérant un rôle des neuropeptides dans l'excitabilité neuronale en conditions inflammatoires (Vilim et al., 1999 ; Voilley et al., 2001 ; Deval et al., 2003 ; Duan et al., 2007).

Les neuropeptides semblent agir directement sur le canal, principalement à l'état fermé ou inactivé (Askwith et al., 2000 ; Catarsi et al., 2001 ; Deval et al., 2003 ; Chen et al., 2006a). Le domaine paume et le connecteur β_{11-12} engagés dans l'inactivation du canal ASIC1a seraient impliqués dans les effets du FMRFamide (Frey et al., 2013).

Enfin, l'activité des canaux ASIC1a est également régulée positivement par deux neuropeptides opioïdes endogènes, la dynorphine A et la « big dynorphine ». Ces dynorphines augmenteraient les dommages neuronaux, notamment dans les cas d'ischémie, en empêchant l'inactivation rapide des canaux ASIC1a (Sherwood et Askwith, 2009).

Les polyamines

Suite à la découverte de l'activation des canaux ASIC3 par le GMQ (Yu et al., 2010), la même équipe a réalisé un criblage de petites molécules qui pourraient agir au niveau du site de fixation du GMQ. Ainsi, ils ont pu mettre en évidence que l'agmatine ($EC_{50} \approx 9.72$ mM), une polyamine naturelle et l'arcaïne ($EC_{50} \approx 1.23$ mM) une molécule naturelle structurellement proche de l'agmatine, étaient capable d'activer spécifiquement les canaux ASIC3 à pH physiologique (Yu et al., 2010).

Ces deux composés ne sont toutefois pas considérés comme des activateurs endogènes mais simplement comme des modulateurs, car à des concentrations physiologiques, ces molécules ne sont pas capables d'activer les canaux ASIC3. A une concentration d'un mM, d'autres polyamines (spermine, spermidine et putrescine) ne sont pas capables d'activer les canaux ASIC3 à pH physiologique (Li et al., 2010).

En revanche, la spermine potentialise les courants ASIC1a, 1b et 1a+2a en décalant leurs courbes d'inactivation vers des pH plus acides. Elle potentialise le courant induit à pH 6.0 dans les neurones hippocampiques de rats ($EC_{50} \approx 495$ μ M) (Babini et al., 2002 ; Duan et al., 2011).

L'acide lactique et l'ATP

Nous avons vu précédemment que les afférences cardiaques présentent des canaux ASIC (Sutherland et al., 2001).

Lors d'une ischémie cardiaque, lorsqu'une artère coronaire est obstruée il y a une diminution du pH (*i.e.*, jusqu'à pH 6.7), ainsi qu'une production d'acide lactique. L'acide lactique n'active pas directement les canaux ASIC natifs à pH physiologique, mais il est capable de potentialiser les courants ASIC1a et ASIC3, ainsi que les courants induits par une acidose extracellulaire dans les neurones DRG innervant le cœur. L'acide lactique agirait en diminuant la concentration extracellulaire des cations divalents. Deux autres acides monocarboxyliques (l'acide pyruvique et l'acide formique) ont un effet similaire à celui de l'acide lactique (Immke et McCleskey, 2001a, 2001b).

En plus de l'acide lactique, les muscles ayant subi une ischémie vont libérer de l'ATP. Dans les neurones DRG innervant les muscles squelettiques, l'ATP augmente le courant natif de type ASIC3 induit par une acidose. L'ATP agirait via un récepteur P2X, qui semble être le récepteur P2X5. Ce récepteur formerait un complexe avec les canaux ASIC3, pour amplifier l'activité de ces derniers (Birdsong et al., 2010).

L'oxyde nitrique

Le NO, un des médiateurs inflammatoires, est susceptible de potentialiser de 157 à 257% le courant transitoire des canaux ASIC1a, 1b, 2a et 3. De plus, dans les neurones DRG de rat, il potentialise également les courants induits par une diminution du pH. Le NO agirait via un site de fixation inconnu situé au niveau de la boucle extracellulaire des canaux ASIC. Chez l'homme une étude utilisant l'iontophorèse a permis de mettre en évidence qu'une application locale d'un donneur de NO augmente l'hypersensibilité acide mais pas les hypersensibilités mécaniques et thermiques (Cadiou et al., 2007).

La sérotonine

La sérotonine comme de nombreux autres médiateurs inflammatoires, tels que la bradykinine, l'IL-1 β et le NGF, induit une augmentation des niveaux des ARN messagers des canaux ASIC1a, 1b, 2b et 3 (Mamet et al., 2002).

La sérotonine potentialise les courants de type ASIC3 dans les neurones DRG de rat.

Cet effet est abolit en présence d'un inhibiteur de la PKC, suggérant un rôle de cette dernière dans les effets de la sérotonine. *In vitro*, la stimulation de la PKC n'a aucun effet sur les canaux ASIC3 homomériques mais potentialise les courants des canaux hétéromériques ASIC3+2b (Deval et al., 2004). La sérotonine est capable de potentialiser le courant soutenu à pH 5.0 des canaux ASIC3 homomériques, ainsi que celui des canaux hétéromériques ASIC3+1a et 3+1b (Wang et al., 2013). La sérotonine pourrait agir, soit via son récepteur 5-HT₂ présents dans les DRG de rats (Qiu et al., 2012), soit directement sur les canaux contenant la sous-unité ASIC3 au niveau du site « non-proton dépendant » (Wang et al., 2013). La co-injection d'acide acétique et de sérotonine chez les souris ou les rats induit un comportement douloureux exacerbé, dont le médiateur est le canal ASIC3 (Qiu et al., 2012 ; Wang et al., 2013).

L'Acide arachidonique

Précédemment, nous venons de voir que plusieurs médiateurs inflammatoires étaient capables de potentialiser l'activité des canaux ASICs. Nous avons également vu que lors d'une inflammation il y avait production d'AA. L'effet de ce dernier a donc été étudié sur les canaux ASIC.

L'application d'AA (1 à 10 μ M) potentialise les composantes transitoires et soutenues des courants ASIC natifs dans les cellules de Purkinje et dans les neurones DRG. L'AA potentialise également les courants homomériques ASIC1a et ASIC3. Cet effet est spécifiquement dû à l'AA et non pas à ses métabolites. L'utilisation d'inhibiteurs des voies de signalisation de l'AA, ainsi que des études de patch-clamp excisé supportent l'idée que l'AA agirait via un mécanisme direct sur les canaux ASIC et non pas via une déformation membranaire (Allen et Attwell, 2002 ; Smith et al., 2007).

L'AA semble avoir un effet plus prononcé sur les canaux ASIC3. Il décale la courbe d'activation des canaux ASIC3 vers des valeurs plus alcalines, engendrant une augmentation du courant de fenêtre. Le décalage de la courbe d'activation est tel, qu'en présence de 10 μ M d'AA, un petit courant ASIC3 constitutif est observé à pH 7.4. (Deval et al., 2008).

Les effets de l'acide arachidonique, ainsi que ceux des autres lipides issus de la dégradation des phospholipides membranaires, les lysophospholipides, seront développés plus en détails dans la partie résultats de ce manuscrit.

Bien que les protons restent le seul activateur endogène des canaux ASIC, de nombreuses molécules, notamment des médiateurs inflammatoires, sont capables de moduler et/ou de réguler leur activité, suggérant une implication dans divers processus physiopathologiques.

e. Modulateurs physico-chimiques

Outre leur sensibilité à de multiples molécules, les canaux ASIC sont également sensibles à des paramètres physico-chimiques, que sont l'hypertonie et la température.

L'hypertonie

De multiples études ont désormais démontré l'implication des canaux ASIC dans la détection de la douleur inflammatoire. Lors d'une inflammation les nombreux médiateurs inflammatoires produits conduisent à une augmentation de l'osmolarité du liquide interstitiel de 280-300 mOsm.L⁻¹ à des valeurs comprises entre 420 et 520 mOsm.L⁻¹ (Schwartz et al., 2009). Le liquide interstitiel additionné de composés inflammatoires est appelé exsudat inflammatoire (Steen et al., 1995).

L'hypertonie (600 mOsm.kg⁻¹) potentialise les courants ASIC induits à pH 7.0 dans les neurones DRG de rats et augmente l'excitabilité neuronale. Seule l'activité des canaux ASIC3 induite par une acidification modérée (*i.e.*, pH 7.2) est potentialisée par l'hypertonie. L'hypertonie ne potentialise ni les courants ASIC3 induits par une acidification plus importante (*i.e.*, pH 6.6), ni les courants ASIC1a. Comme l'AA, l'hypertonie entraîne un agrandissement du courant de fenêtre.

L'hypertonie accompagnée d'une acidose modérée et d'AA génèrent une douleur cutanée chez le rat. Cette douleur est inhibée par la toxine inhibitrice des canaux ASIC3, l'APETx2 (Deval et al., 2008). L'hypertonie, une acidose modérée et l'agmatine agissent de manière synergique pour faciliter l'activation des canaux ASIC3, renforçant encore le rôle prépondérant de ces canaux dans l'inflammation (Li et al., 2010).

La température

La majorité des molécules et des réactions chimiques sont sensibles à la température. Pour mesurer la dépendance d'un phénomène à la température on mesure son Q_{10} . Le Q_{10} est un coefficient qui mesure le taux de variation d'un paramètre pour une variation de température de 10° . Par convention, on considère qu'un Q_{10} supérieur à 3 démontre une forte sensibilité à la température.

Pour rappel, lorsque la température diminue le pH augmente et inversement, ce qui nous donne les données suivantes :

Température	pH
30°C	7.40
25°C	7.48
20°C	7.56
15°C	7.64

Tableau 6 : Relation température et pH.

(Valeurs mesurées durant ma thèse).

Les premiers travaux sur la régulation des canaux ASIC par la température ont montré qu'un refroidissement du milieu extracellulaire de 34 à 6°C potentialisait le courant global ASIC2a à pH 4.0, en ralentissant l'inactivation. A 6°C le courant ASIC2a ne s'inactive pratiquement pas, alors qu'à 34°C il est diminué de 85%. Entre 20 et 30°C le Q_{10} du τ d'inactivation (constante de temps d'inactivation) des canaux ASIC3 et ASIC1a est d'environ 4.4. Ces résultats suggèrent que l'inactivation des canaux ASIC est fortement sensible aux variations de température (Askwith et al., 2001). C'est la seule étude qui s'est réellement intéressée aux effets d'une température froide sur les canaux ASIC. Néanmoins on peut émettre un bémol concernant cette étude. En effet, dans cette étude le pH du milieu extracellulaire semble avoir été mesuré à température ambiante, sans être ajusté par la suite à chaque température de stimulation.

Lors d'un refroidissement il y a une alcalinisation du pH. Les auteurs ont donc pu passer à côté de certains effets de la température froide sur les canaux ASIC.

Les effets du froid sur les canaux ASIC constituent la deuxième partie de mes travaux de thèse, ils seront détaillés dans la partie résultats.

Deux études se sont penchées sur les effets d'un réchauffement sur l'activité des canaux ASIC. Les résultats obtenus dans ces deux études présentent des divergences et des similarités. Dans la première étude (Neelands et al., 2010), un réchauffement de 25 à 35°C ne change pas l'amplitude du courant transitoire de type ASIC dans les neurones DRG de rat, alors que dans la deuxième étude l'amplitude du pic des courants de type ASIC1 et ASIC3 est fortement réduite à 35°C dans les mêmes neurones (Blanchard et Kellenberger, 2011). Pour ces deux études la quantité du courant total est diminuée lors d'un réchauffement. Cette diminution est due à une accélération de l'inactivation des canaux ASIC lors d'un réchauffement de 25 à 35°C. A température physiologique, les canaux ASIC s'inactivent plus rapidement qu'à température ambiante (Neelands et al., 2010). Toutefois, les résultats ensuite obtenus sur les canaux ASIC exprimés en système hétérologue sont quelque peu différents. Contrairement aux résultats obtenus sur les DRG, il semble que les canaux ASIC3 soient les moins sensibles au réchauffement.

A 35°C, la densité des courants transitoires ASIC3 recombinants est la même qu'à 25°C, alors que celle des canaux ASIC1a et 1b est diminuée et celle des canaux ASIC2a légèrement augmentée. Bien que l'inactivation soit plus rapide à 35°C, les Q_{10} des τ d'inactivation des canaux homomériques ASIC1a, 1b, 2a et 3 ne sont pas très élevés avec des valeurs respectives de 1.9, 2.2, 3.1 et 1.6 (entre 25 et 35°C).

A 25°C et à 35°C les $pH_{0.5}$ d'activation ne sont pas modifiés alors qu'il y a un décalage vers des pH plus alcalins des $pH_{0.5}$ d'inactivation des canaux ASIC1a, 1b et 2a.

La différence observée entre les résultats obtenus sur les neurones DRG et les cellules transfectées pourraient être expliquées par le fait que dans les DRG, les canaux ASIC ne sont pas forcément des homomères. Les courants observés sont de type ASIC3, c'est-à-dire qu'ils ressemblent à des courants ASIC3, mais qu'ils peuvent être dus à des hétéromères (Blanchard et Kellenberger, 2011).

D'après ces trois études, des variations de températures modifient l'activité des canaux ASIC, sans toutefois générer d'activité indépendante d'une acidose extracellulaire.

4. Rôles des canaux ASIC dans la douleur

a. Distribution des ASIC dans les voies de la douleur

Les canaux ASIC sont présents tout au long des voies de la douleur aussi bien au niveau du système nerveux périphérique et central.

Dès les premiers articles sur les « récepteurs des protons », les courants ASIC ont été étudiés au niveau des neurones sensoriels (Krishtal et Pidoplichko, 1981a), laissant supposer qu'ils pouvaient être impliqués dans la nociception (Krishtal et Pidoplichko, 1981b). Depuis, il a été montré que toutes les sous-unités ASIC sont présentes dans les neurones de petits diamètres ou nocicepteurs (Voilley et al., 2001 ; Poirot et al., 2006). Les canaux ASIC, notamment les canaux ASIC3, sont présent au niveau des neurones DRG innervant la peau (Garcia-Anoveros et al., 2001 ; Price et al., 2001 ; Deval et al., 2008 ; Kang et al., 2012), les muscles (Sluka et al., 2003 ; Molliver et al., 2005 ; Gao et al., 2006 ; Gautam et Benson, 2013) et les articulations (Ikeuchi et al., 2008 ; Ikeuchi et al., 2009 ; Izumi et al., 2012).

Au niveau de la moelle épinière, les sous-unités ASIC1a, 2a et 2b sont fortement exprimées dans les neurones de second ordre qui reçoivent les afférences des neurones sensoriels et qui sont notamment impliqués dans la modulation et la transmission du message douloureux (Chen et al., 1998 ; Baron et al., 2002a ; Chen et al., 2002 ; Wemmie et al., 2002 ; Wemmie et al., 2003 ; Wu et al., 2004 ; Duan et al., 2007 ; Baron et al., 2008). Dans ces neurones, l'expression d'ASIC1a et d'ASIC2a est d'ailleurs augmentée lors d'une inflammation périphérique (Wu et al., 2004).

Au niveau supraspinal, les canaux ASIC1 et ASIC2 sont largement exprimés dans de très nombreuses structures impliquées dans la douleur, telles que la substance grise périaqueducale, l'amygdale, l'hypothalamus et le cortex (Price et al., 1996 ; Waldmann et al., 1996 ; Bassilana et al., 1997 ; Lingueglia et al., 1997 ; Waldmann et al., 1997a ; Baron et al., 2002a ; Wemmie et al., 2002 ; Alvarez de la Rosa et al., 2003 ; Askwith et al., 2004 ; Price et al., 2014).

b. Douleur cutanée

Chez l'homme, l'infusion ou l'injection d'une solution acide par voie intradermique ou sous-cutanée génère une douleur qui est proportionnelle à l'acidité de la solution (Steen et Reeh, 1993 ; Ugawa et al., 2002 ; Jones et al., 2004).

L'utilisation d'inhibiteurs des canaux ASIC (amiloride et diclofénac) et TRPV1 (capsazépine) a permis de montrer que les canaux ASIC, plus particulièrement ASIC1a et ASIC3, étaient les seuls impliqués dans la douleur acide cutanée modérée chez l'homme [**Figure 26**] (Ugawa et al., 2002 ; Jones et al., 2004).

Pour étudier plus précisément le rôle des canaux ASIC dans la douleur cutanée, l'utilisation de rongeurs fut primordial. Pourtant les premières expériences menées grâce aux souris invalidées (KO : « knock-out ») pour les différents canaux ASIC, KO ASIC1a (Wemmie et al., 2002), KO ASIC2 (Price et al., 2000 ; Roza et al., 2004) et KO ASIC3 (Price et al., 2001 ; Chen et al., 2002 ; Wultsch et al., 2008) ne se sont pas révélées très concluantes.

En effet, l'injection d'une solution acide induit chez les souris sauvages une réponse douloureuse qui n'est pas altérée chez les souris KO ASIC1a (Page et al., 2004), KO ASIC2a (Price et al., 2000) et KO ASIC3 (Price et al., 2001 ; Chen et al., 2002). Au contraire, la réponse douloureuse suite à l'injection d'une solution d'acide acétique à 0.6% est même exacerbée chez les souris KO ASIC3. Alors que, l'hyperalgie thermique et l'allodynie mécanique inflammatoire induites par l'injection de carragénine sont similaires chez les souris sauvages et KO ASIC3 (Chen et al., 2002). En revanche, les souris KO ASIC3 présentent des différences au niveau de leur sensibilité mécanique. Les fibres mécano- nociceptives myélinisées à conduction lente (A δ) sont moins sensibles aux stimuli mécaniques chez les souris KO ASIC3, alors que les fibres mécaniques à adaptation rapide (A β) sont hypersensibles (Price et al., 2001). Par rapport aux souris sauvages, les souris KO ASIC1a ne présentent pas de différence de perceptions non-nocives et nocives thermique et mécanique au niveau cutané (Page et al., 2004). L'utilisation sous-cutanée de la toxine PcTx1 n'induit pas d'analgésie périphérique, confirmant les résultats précédents (Mazzuca et al., 2007 ; Diochot et al., 2012).

Il a fallu attendre l'identification d'un nouvel activateur des canaux ASIC, le GMQ, pour mettre en évidence chez la souris un rôle des canaux ASIC3 au niveau de la douleur cutanée.

L'injection intraplantaire (sous-cutanée) de GMQ induit un comportement douloureux chez les souris sauvages [**Figure 24A**]. Cette douleur est presque totalement inhibée chez les souris KO ASIC3 [**Figure 24B**], mais pas chez les KO ASIC1a (Yu et al., 2010).

Au cours de ma thèse j'ai également pu montrer que l'injection d'un cocktail de lipides (AA + LPC) sur le dessus de la patte en sous-cutanée chez la souris induisait un comportement douloureux qui est altéré chez les souris KO ASIC3 (Marra et al., 2016).

Enfin, grâce à l'apport des mambalgines, la sous-unité ASIC1b, jusqu'alors jamais impliquée dans la perception douloureuse, apparaît comme importante dans la détection des douleurs cutanées et dans l'hyperalgie thermique inflammatoire chez la souris [**Figure 26**] (Diochot et al., 2012).

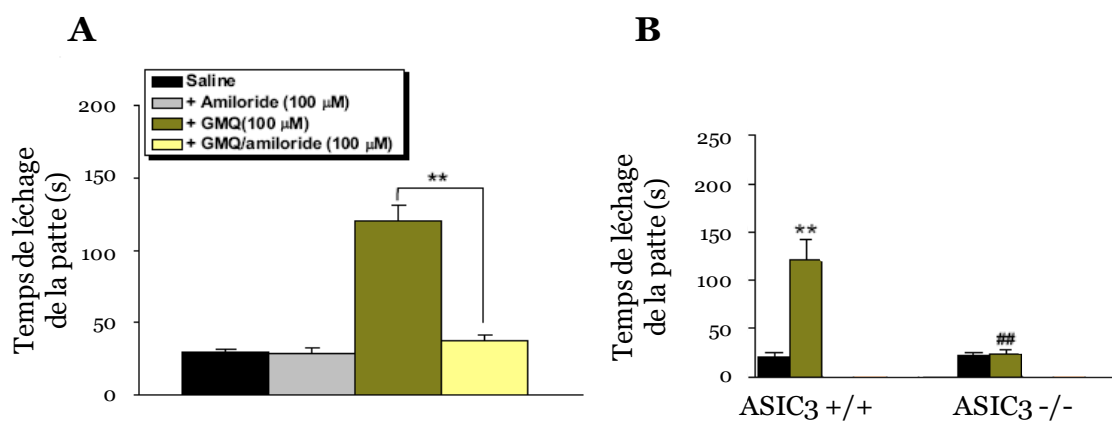


Figure 24 : GMQ, douleur et ASIC3.

A. Le GMQ à 100 μ M induit un comportement douloureux (léchage de la patte) chez la souris. Ce comportement est significativement diminué en présence d'amiloride, un bloqueur non discriminant des canaux ASIC.

B. Le GMQ induit une douleur chez les souris sauvages (ASIC3 +/+), qui est intégralement abolie chez les KO ASIC3, démontrant la spécificité de l'effet du GMQ sur ASIC3 (** : GMQ vs solution saline ; ## : GMQ ASIC3 KO vs GMQ ASIC3 +/+).

(D'après Yu et al., 2010).

L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques des ASIC et/ou d'ARN interférents (siRNA) entraînant une diminution de l'expression des canaux ASIC (KD : « knock-down »), ont permis d'obtenir chez le rat des données plus robustes.

L'utilisation d'un inhibiteur non discriminant, le A-317567, a permis de montrer, le rôle des canaux ASIC dans un modèle d'hyperalgie thermique inflammatoire et dans un modèle de douleur postopératoire (Dubé et al., 2005). L'implication d'ASIC3 dans le développement des douleurs postopératoires a été renforcé dans une étude combinant l'utilisation d'APETx2 et de siRNA dirigés contre ASIC3 (Deval et al., 2011). Le rôle prépondérant des canaux ASIC3 dans la douleur cutanée, a également été démontré en utilisant la même approche combinatoire. Une acidification sous-cutanée, ou une injection acide hyper-osmotique contenant de l'AA génèrent une douleur qui est abolie en présence de la toxine APETx2. Dans un modèle d'hyperalgie inflammatoire thermique au CFA (Complete Freund's Adjuvant), l'injection d'APETx2 ou d'un siRNA dirigée contre ASIC3 abolit la réponse douloureuse au chaud, contrairement à la toxine PcTx1 qui n'a aucun effet (Duan et al., 2007 ; Deval et al., 2008).

Ces résultats renforcent l'importance des canaux ASIC3 dans la douleur cutanée, notamment en cas d'inflammation. Lors d'une inflammation, l'expression des canaux ASIC3 est augmentée d'un facteur 15 dans les DRG de rats et les médiateurs inflammatoires potentialisent l'activité des canaux ASIC (Mamet et al., 2002 ; Deval et al., 2004 ; Cadiou et al., 2007 ; Deval et al., 2008).

Les canaux ASIC3 sont donc des acteurs majeurs de la douleur cutanée chez le rat.

Chez la souris, l'absence de phénotype douloureux clair ne permet pas de conclure quant à l'importance de ces canaux au niveau cutané. Ces observations pourraient être dues à des différences de niveau d'expression basale des canaux ASIC dans les DRG entre la souris et le rat ou à des phénomènes de compensations chez les souris KO.

Les courants ASIC dans les neurones DRG, et en particulier dans les nocicepteurs, sont moins fréquents et de plus faibles amplitudes chez la souris que chez le rat (Molliver et al., 2005 ; Leffler et al., 2006 ; Deval et al., 2008 ; Lin et al., 2008).

De plus, il existe des différences génétiques, physiologiques et comportementales inter-espèces entre rats et souris qui peuvent être à l'origine de réponses douloureuses différentes (Wilson et Mogil, 2001 ; Mogil, 2009).

Contrairement à la douleur cutanée où les données divergent entre rats et souris, le rôle des ASIC dans la douleur musculosquelettique est bien caractérisé chez ces deux espèces.

c. Douleurs musculaire et articulaire

Les douleurs musculaire et cutanée présentent des différences dans leurs mécanismes physiologiques et dans leurs manières d'être ressenties par un individu. Contrairement à la douleur cutanée qui est facilement et précisément localisable, la douleur musculaire, comme toutes douleurs des tissus profonds, est plus diffuse et donc par conséquent plus difficilement localisable. De plus, une douleur cutanée est perçue comme vive, piquante, elle ressemble à une coupure ou une brûlure, alors qu'une douleur musculaire est elle perçue comme lancinante et ressemblant à une crampe (Mense, 2008).

Chez l'homme l'infusion d'une solution à pH 5.2 dans le muscle tibial antérieur génère une douleur ipsilatérale au niveau du site d'infusion ainsi qu'une douleur référée (*i.e.*, douleur ressentie à distance du site local de la lésion) au niveau de la cheville. Les sujets développent également une hyperalgie mécanique au niveau des deux sites (Issberner et al., 1996 ; Frey Law et al., 2008).

Le rôle des canaux ASIC dans la douleur musculaire chez les rongeurs a été mis en évidence la première fois suite à l'injection unique d'une solution acide à pH 4.0 dans le muscle gastrocnémien chez la souris. Cette injection génère une hyperalgie mécanique secondaire (*i.e.*, à distance du site d'injection) significativement réduite chez les souris KO ASIC3 (Price et al., 2001).

La même année un modèle de douleur musculaire de longue durée a été développé. Ce modèle consiste cette fois-ci en deux injections à cinq jours d'intervalle d'une solution acide dans le muscle gastrocnémien.

Cette double injection induit une hyperalgie mécanique secondaire du côté ipsilatéral mais aussi du côté controlatéral [**Figures 25A et 25B**]. La durée et l'intensité de cette douleur persistante sont proportionnelles à l'acidité de la solution. En effet, une solution à pH 4.0 induit une hyperalgie bilatérale qui dure plus de quatre semaines, alors qu'elle ne dure qu'une dizaine de jours si la solution est à pH 6.0 (Sluka et al., 2001). En utilisant ce modèle, il a été montré que l'injection d'amiloride dans le muscle gastrocnémien abolit l'hyperalgie mécanique secondaire, suggérant un rôle des canaux ASIC dans ce phénomène. Cet effet est dû aux canaux ASIC3, car l'hyperalgie est complètement abolie chez les KO ASIC3 [**Figures 25C et 25D**], alors que les KO ASIC1a développent toujours l'hyperalgie chronique.

Pour expliquer la bilatéralité de l'hyperalgie, des enregistrements de l'activité électrique des neurones WDR (*i.e.*, des neurones qui répondent à la fois aux stimuli non nocif et nocif) de la moelle épinière ont été réalisés. Ils ont permis de montrer (i) que quatre heures après une injection de pH 4.0, la taille du champ récepteur d'un neurone WDR côté ipsilatéral est augmentée et se propage même jusqu'à la patte opposée et (ii) que chez les KO ASIC3 ce champ récepteur augmente légèrement côté ipsilatéral mais n'atteint pas le côté controlatéral. Les canaux ASIC3 sont donc importants pour le développement de l'hyperalgie secondaire et la sensibilisation centrale (Sluka et al., 2003).

Au niveau musculaire, l'implication des canaux ASIC a également été étudiée suite à une inflammation. Lorsqu'elle est induite par une injection de carragénine dans la patte gauche, elle entraîne une augmentation bilatérale de l'expression des ARN messagers d'ASIC2 et d'ASIC3 dans les DRG lombaires (Walder et al., 2010). Les canaux ASIC3, ne sont pas impliqués dans le développement de l'inflammation musculaire, mais ils seraient responsables de l'hyperalgie mécanique, mais pas thermique après une inflammation musculaire induite par le CFA (Sluka et al., 2007).

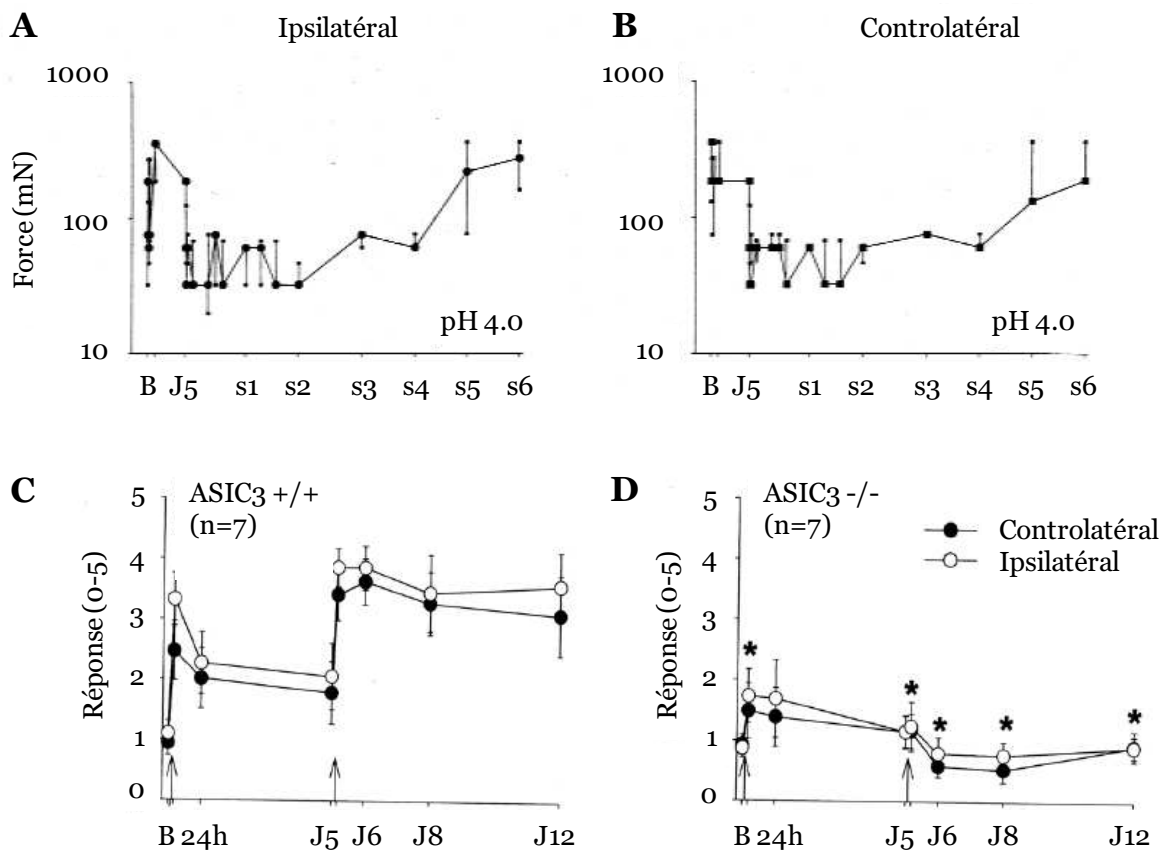


Figure 25 : Modèle de douleur musculaire chronique.

A. Le seuil de sensibilité mécanique est mesuré grâce à des filaments de Von Frey. La première injection d'une solution à pH 4.0 entraîne une hyperalgie mécanique (abaissement du seuil) qui disparaît rapidement. La deuxième injection, cinq jours après, induit une hyperalgie mécanique qui dure au moins 4 semaines.

B. L'hyperalgie mécanique devient bilatérale après la deuxième injection.

C. Les souris sauvages (ASIC3 +/+) développent une hyperalgie mécanique bilatérale qui dure au moins une semaine après la deuxième injection.

D. Chez les souris KO ASIC3, les deux injections d'acide n'induisent pas d'hyperalgie mécanique, ni du côté ipsilatéral, ni du côté bilatéral (* : Ipsilatéral ASIC3 -/- vs Ipsilatéral ASIC3 +/+).

(D'après Sluka et al., 2001 ; Sluka et al., 2003).



L'utilisation des différentes souris KO, a permis de montrer que les canaux ASIC1a sont importants pour le développement de l'hyperalgie musculaire primaire mais pas secondaire, a contrario les canaux ASIC3 ne participent qu'au développement de l'hyperalgie secondaire [**Figure 26**] (Walder et al., 2010).

Chez le rat l'injection de la toxine APETx2, inhibitrice d'ASIC3, démontre comme chez la souris le rôle de ces canaux dans l'hyperalgie mécanique bilatérale suite à l'injection d'une solution acide dans le muscle gastrocnémien (Karczewski et al., 2010). La toxine APETx2 et un siRNA dirigé contre ASIC3 bloquent également la douleur posturale et l'hyperalgie thermique primaire induites par une incision musculaire mimant une opération chirurgicale (Deval et al., 2011).

Enfin, outre les données comportementales, des résultats d'immunocytochimie, de marquage rétrograde et d'électrophysiologie ont montré que la sous-unité ASIC3 est particulièrement présente dans 50% des neurones de petit diamètre innervant le muscle quadriceps (Molliver et al., 2005) et dans 75% des neurones DRG innervant le muscle plantaire chez le rat (Deval et al., 2011).

Au niveau du système musculosquelettique, les canaux ASIC3 participent également aux douleurs articulaires chez la souris et le rat.

Chez la souris, l'injection de carragénine au niveau de l'articulation du genou induit une inflammation et conduit au développement d'une hyperalgie mécanique bilatérale. Comme au niveau musculaire, par rapport aux souris sauvages, les souris KO ASIC3 ne développent pas d'hyperalgie mécanique secondaire, alors que les hyperalgies primaires mécaniques et thermiques sont inchangées. En condition inflammatoire, ASIC3 est localisé au niveau des fibres afférentes innervant l'articulation du genou, alors qu'il n'y en a pas en condition basale (Ikeuchi et al., 2008). Un an après, le même groupe a cette fois mis en évidence la présence d'ASIC3 dans 31% des afférences innervant le genou, contredisant leur précédente étude, qui n'avait pas permis la mise en évidence de cette sous-unité en condition basale. Dans un modèle d'arthrite induite par la carragénine, ils ont également montré que 50% des afférences innervant le genou présentent des ASIC3, confirmant la régulation positive de ces canaux en cas d'inflammation articulaire (Ikeuchi et al., 2009).

Dans un modèle d'ostéo-arthrite du genou, il y a une augmentation de l'expression d'ASIC3 dans les afférences innervant cette articulation et les rats développent une douleur posturale et une hyperalgie mécanique secondaire. L'administration précoce d'APETx2 dans ce modèle induit plusieurs effets. Elle inhibe la surexpression d'ASIC3 au niveau des afférences articulaires du genou et inhibe l'hyperalgie mécanique secondaire et la douleur posturale. L'utilisation d'APETx2 protège également contre les lésions cartilagineuses (Izumi et al., 2012).

Un modèle similaire à celui développé par Kathleen Sluka en 2001 (Sluka et al., 2001) a été mis au point au niveau articulaire chez le rat. Une double injection unilatérale, à cinq jours d'intervalle, d'une solution à pH 4.0 en intra-articulaire induit des hyperalgies mécaniques primaires et secondaires bilatérales qui durent au moins quatre semaines, ainsi qu'une douleur posturale. L'injection précoce d'APETx2 empêche le développement des hyperalgies mécaniques primaires et secondaires bilatérales. Les canaux ASIC3 semblent nécessaires au développement de l'hyperalgie, mais pas pour son maintien, qui implique le système nerveux central (Sugimura et al., 2015).

Les canaux contenant la sous-unité ASIC3 semblent donc être une cible thérapeutique d'intérêt dans le traitement des douleurs musculaires qu'elles soient ou non inflammatoires, ainsi que dans les pathologies articulaires telles que l'arthrite.

d. Douleur viscérale

Comme le système musculosquelettique, les viscères localisés dans la cavité abdominale et la cage thoracique appartiennent aux tissus profonds.

Douleur gastro-intestinale

Les troubles gastro-intestinaux touchent un tiers de la population. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin affectent plus de deux millions de personnes en Europe (Brierley et al., 2010). Le système gastro-intestinal reçoit des afférences des neurones situés dans les ganglions rachidiens et noueux.

Des enregistrements électrophysiologiques montrent que la quasi-totalité des neurones DRG et 55% des neurones des ganglions noueux gastriques de rats possèdent des canaux ASIC. En cas d'ulcère gastrique, il y a une modification des cinétiques de courants, une augmentation de la sensibilité aux protons et de la densité de courant des canaux ASIC (Sugiura et al., 2005). Plus tard, il a été montré que les canaux ASIC3, mais pas les canaux ASIC2, participent au développement de l'hyperréactivité gastrique associée à une gastrite (Wultsch et al., 2008). Contrairement à la mécanoperception cutanée, les canaux ASIC1a sont impliqués dans la perception mécano-viscérale. La délétion d'ASIC1a entraîne une hypersensibilité des fibres afférentes innervant l'œsophage, l'estomac et le colon, suggérant une participation de cette sous-unité au fonctionnement « normal » des fibres afférentes (Page et al., 2004).

Chez la souris, les canaux ASIC1, ASIC2 et majoritairement ASIC3 sont présents dans les neurones innervant le colon. Les ASIC3 sont présents dans 73% des neurones, alors que les ASIC1 et ASIC2 sont respectivement dans 30 et 47% des neurones du colon (Hughes et al., 2007).

Chez l'homme, il y a seulement une surexpression des canaux ASIC3 dans la muqueuse du colon des patients ayant une pathologie inflammatoire du colon (*i.e.*, maladie de Crohn) (Yiangou et al., 2001).

Chez la souris, le colon est innervé par quatre classes de fibres afférentes. La délétion des canaux ASIC3 montre une diminution de la sensibilité mécanique dans trois des quatre classes de fibres, contrairement aux KO ASIC1a qui présentent eux une hypersensibilité. Les résultats obtenus avec les KO ASIC2 sont hétérogènes selon les classes de fibres et la localisation gastro-œsophagienne ou colonique, engendrant des hypo et des hypersensibilités. L'ensemble des canaux ASIC sont donc impliqués dans la perception mécanique au niveau du colon (Page et al., 2005 ; Page et al., 2007).

Les souris KO ASIC3 sont moins sensibles à la distension colorectale, qu'elle soit ou non associée à une inflammation. Elles ne présentent pas non plus de sensibilisation des fibres afférentes en cas d'inflammation (Jones et al., 2005 ; Jones et al., 2007).

Les canaux ASIC et plus particulièrement ASIC3, constituent une cible thérapeutique potentielle dans le traitement des douleurs gastro-intestinales [**Figure 26**].

Douleur thoracique

Lors d'une ischémie cardiaque suite à une occlusion artérielle ou une stimulation auriculaire, le pH mesuré au niveau du tissu cardiaque dans des modèles animaux (Jacobus et al., 1977 ; Pan et al., 1999) ou chez des patients (Cobbe et Poole-Wilson, 1982) diminue rapidement. La douleur ressentie lors d'une angine de poitrine suite à une ischémie cardiaque est ressentie grâce à des neurones situés dans les DRG et les ganglions noueux.

Chez le rat, les neurones innervant le cœur présentent de forts courants ASIC. Les canaux ASIC pourraient donc participer à la douleur ressentie lors d'une ischémie cardiaque (Benson et al., 1999). De par sa forte sensibilité aux protons, le principal candidat est le canal ASIC3.

En effet, quelques minutes seulement après une crise cardiaque, le pH atteint une valeur inférieure à pH 7.0, valeur suffisante pour activer les canaux ASIC3. Les propriétés électrophysiologiques des courants des neurones des afférences cardiaques induits par une diminution du pH sont similaires en tout point aux propriétés des courants ASIC3. Il a ainsi été proposé que la douleur ischémique serait perçue grâce aux canaux homomériques ASIC3 et hétéromériques ASIC3+2b (Sutherland et al., 2001). La faible acidification engendrée lors d'une ischémie génère un courant soutenu persistant dans les neurones cardiaques. Ce courant soutenu correspond au courant de fenêtre retrouvé dans les canaux ASIC3 et ASIC3+2b, (Yagi et al., 2006 ; Deval et al., 2008). Lors d'une ischémie, le lactate produit potentialise fortement l'activité des canaux ASIC3 (Immke et McCleskey, 2001a, 2001b), renforçant l'implication d'ASIC3 dans la douleur cardiaque (Immke et McCleskey, 2001a, 2001b ; Sutherland et al., 2001 ; Yagi et al., 2006).

Chez la souris, les courants retrouvés dans les afférences cardiaques sont plutôt de type ASIC3+2a [**Figure 26**] (Hattori et al., 2009).

Contrairement aux autres viscères, il n'y a pas de douleur généralement détecté au niveau du tractus respiratoire. Le pH des voies respiratoires est diminué dans certaines conditions pathologiques telles qu'une inflammation pulmonaire, des apnées du sommeil ou une broncho-pneumopathie chronique obstructive (Kollarik et Undem, 2002).

Une diminution du pH induit un courant sodique inhibé par l'amiloride dans les neurones sensoriels pulmonaires, démontrant la présence de canaux ASIC dans ces afférences (Gu et Lee, 2006). La même année, la présence des canaux ASIC₃ dans les neurones sensoriels innervant tout le tractus respiratoire a été démontré par immunofluorescence (Fukuda et al., 2006). L'acide citrique induit une toux chez le cochon d'inde qui impliquerait les canaux ASIC (Canning et al., 2006).

Au niveau du tractus respiratoire, les canaux ASIC seraient donc plutôt impliqués dans des processus physiopathologiques non douloureux (*p. ex.*, toux, asthme) (Reznikov et al., 2016).

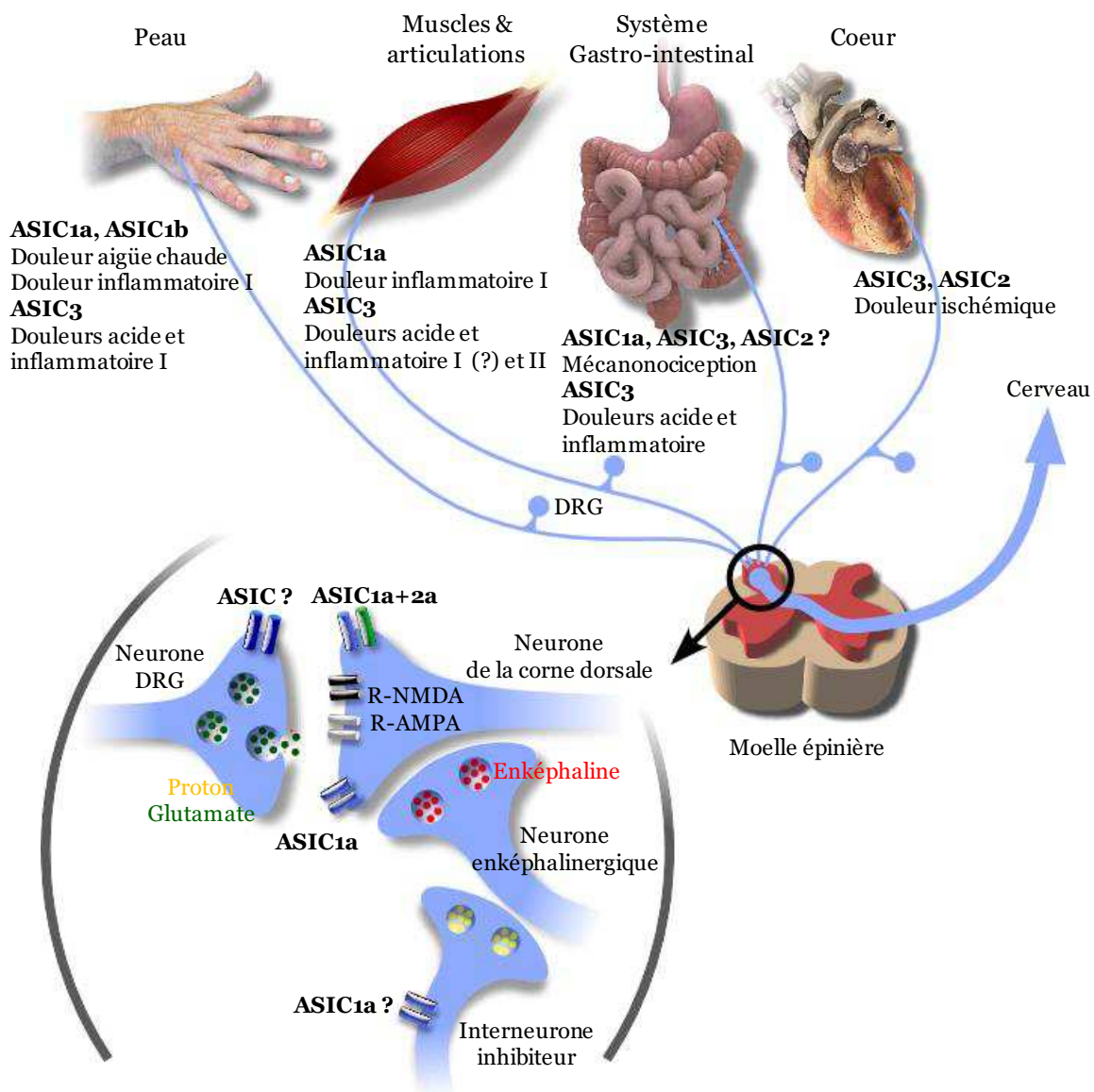


Figure 26 : ASIC périphériques et douleur.

Les canaux ASIC, et particulièrement ASIC3, sont présents au niveau du système nerveux périphérique. Ils sont impliqués dans différents types de douleurs, telles que les douleurs aiguës, inflammatoires et ischémiques. Ils sont également présents du côté post-synaptique au niveau de la synapse entre les neurones de premier et de second ordre.

(D'après Deval et al., 2010).

e. Douleur migraineuse

La migraine affecte 14% de la population ce qui en fait la 3^{ème} pathologie la plus répandue dans le monde (Vos et al., 2012). Dans certains cas, la crise est précédée par une période de désordres neurologiques sensoriels transitoires. Ces désordres nommés «aura», concernent 20 à 30% des patients migraineux et seraient dus à la dépression corticale envahissante (DCE) (Russell et al., 1996 ; Hansen et al., 2013).

Les premiers arguments en faveur d'un lien entre ASIC et migraine reposent sur le fait que des composés inflammatoires (NGF, sérotonine et NO) liés à la migraine sont capables de potentialiser l'activité des canaux ASIC (Dussor, 2015). La première évidence d'un rôle des ASIC dans la migraine provient d'une étude montrant que la DCE induite par une pique au niveau cortical est inhibée par deux bloqueurs des canaux ASIC, l'amiloride et la PcTx1. Ces résultats démontrent pour la première fois un rôle des canaux ASIC1a dans la migraine. Toutefois, les canaux ASIC1a ne sont pas impliqués dans toutes les formes de DCE. La DCE induite par une forte concentration de potassium n'est pas inhibée par ces bloqueurs. Les mêmes auteurs ont réalisé un test sur un petit groupe de sept patients ayant des migraines avec auras résistantes aux traitements. Sur ces sept patients qui avaient tous reçus de l'amiloride, quatre ont observé une diminution de la fréquence des auras et de la sévérité des maux de tête (Holland et al., 2012).

Les ASIC sont présents au niveau des ganglions trigéminaux (Olson et al., 1998) qui innervent les méninges crâniennes, où ces canaux pourraient être les senseurs de l'acidification extracellulaire au niveau de la dure-mère (Burstein, 2001). L'activation des canaux ASIC au niveau des fibres afférentes de la dure-mère génère un courant de fenêtre et pourrait participer au développement des maux de tête. De plus, l'application d'une solution à pH 5.0 au niveau de la dure-mère génère des douleurs faciales et extra-faciales (au niveau de la patte) inhibées par l'amiloride (Yan et al., 2011). L'utilisation d'APETx2 et de GMQ ont permis de montrer que cet effet est principalement porté par les canaux contenant la sous-unité ASIC3 qui est présente dans 80% des afférences de la dure-mère. L'activité des canaux ASIC3 au niveau de ces afférences est fortement potentialisée par la dégranulation mastocytaire (Yan et al., 2013).

Les bloqueurs des canaux ASIC pourraient donc avoir un intérêt thérapeutique pour diminuer les douleurs migraineuses.

RÉSULTATS

Les canaux ASIC, plus particulièrement les canaux ASIC₃, sont des canaux qui sont impliqués dans les perceptions sensorielles et douloureuses. Bien qu'uniquement activés par les protons extracellulaires, ces canaux sont sensibles à de multiples composés inflammatoires et paramètres physico-chimiques. Les canaux ASIC₃ apparaissent donc de plus en plus comme des détecteurs de coïncidences et non plus seulement comme des senseurs de l'acidité extracellulaire.

C'est dans ce contexte liant douleur et détecteurs de coïncidences, que lors de la première partie de ma thèse, je me suis intéressé à la régulation des canaux ASIC₃ par des composés inflammatoires lipidiques.

Parallèlement à ce projet des résultats préliminaires obtenus au laboratoire suggéraient que les canaux ASIC₃ possédaient une forte sensibilité thermique froide. Cette sensibilité au froid des canaux ASIC₃ n'est que très peu documentée dans la littérature. Lors de la seconde partie de ma thèse je me suis donc focalisé sur la régulation des canaux ASIC₃ par les températures froides.

A- RÉGULATION DES CANAUX ASIC₃ PAR DES LIPIDES INFLAMMATOIRES

1. Préface de l'étude

Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire par le Dr Emmanuel Deval, le Dr Anne Delaunay lors de sa thèse et moi-même lors de mon stage de master 2 montrent que des lipides produits en cas d'inflammation, tels que l'AA (Deval et al., 2008) et la LPC sont capables de moduler l'activité des canaux ASIC.

Parallèlement, grâce à une collaboration avec le service de rhumatologie du Pr Liana Euller-Ziegler du CHU de Nice, nous disposons d'exsudats inflammatoires humains. Ces exsudats proviennent de ponctions articulaires réalisées chez des patients souffrant de différentes pathologies rhumatismales (*i.e.*, polyarthrite rhumatoïde, spondylarthrite ankylosante et ostéo-arthrite).

Plusieurs études ont démontré un rôle des canaux ASIC3 dans les douleurs inflammatoire et articulaire chez les rongeurs (Ikeuchi et al., 2008 ; Izumi et al., 2012 ; Sugimura et al., 2015). Les canaux ASIC3 pourraient donc participer à la perception douloureuse associée à ces pathologies chez l'homme.

Lors de la première partie de ma thèse, j'ai donc poursuivi l'étude de l'effet des lipides inflammatoires sur les canaux ASIC. J'ai ainsi pu établir un lien entre l'AA, la LPC et les exsudats inflammatoires humains. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication présentée ci-après.

L'article « **Non-acidic activation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 3 by lipids** » résulte d'une collaboration entre plusieurs équipes. Dans cette étude, les exsudats inflammatoires proviennent des praticiens hospitaliers niçois, l'analyse lipidomique et la SICM (« scanning ion conductance microscopy ») ont été réalisées par nos collaborateurs poitevins. L'ensemble des expériences électrophysiologiques et de comportements ont été faites au laboratoire.

A l'exception des résultats présentés dans les figures 3A, 3B (Dr Anne Delaunay) et 6C (Dr Marine Christin et Pr Jacques Noël), l'ensemble des données de patch-clamp et comportementales décrites dans l'article sont le fruit de mon travail de thèse.

Grâce à une approche translationnelle inverse, nous avons mis en évidence des nouveaux activateurs endogènes des canaux ASIC3. Deux lipides présents dans des exsudats inflammatoires humains douloureux, l'AA et la LPC, sont donc capables d'activer à pH physiologique les canaux ASIC3 et de générer un comportement douloureux qui met en jeu ces mêmes canaux. Cette étude renforce l'idée que les canaux ASIC3 sont des détecteurs de coïncidences, ainsi que leur implication dans les douleurs inflammatoires.

Ces canaux pourraient être des cibles thérapeutiques d'intérêts pour soulager les douleurs accompagnant certaines pathologies rhumatismales.

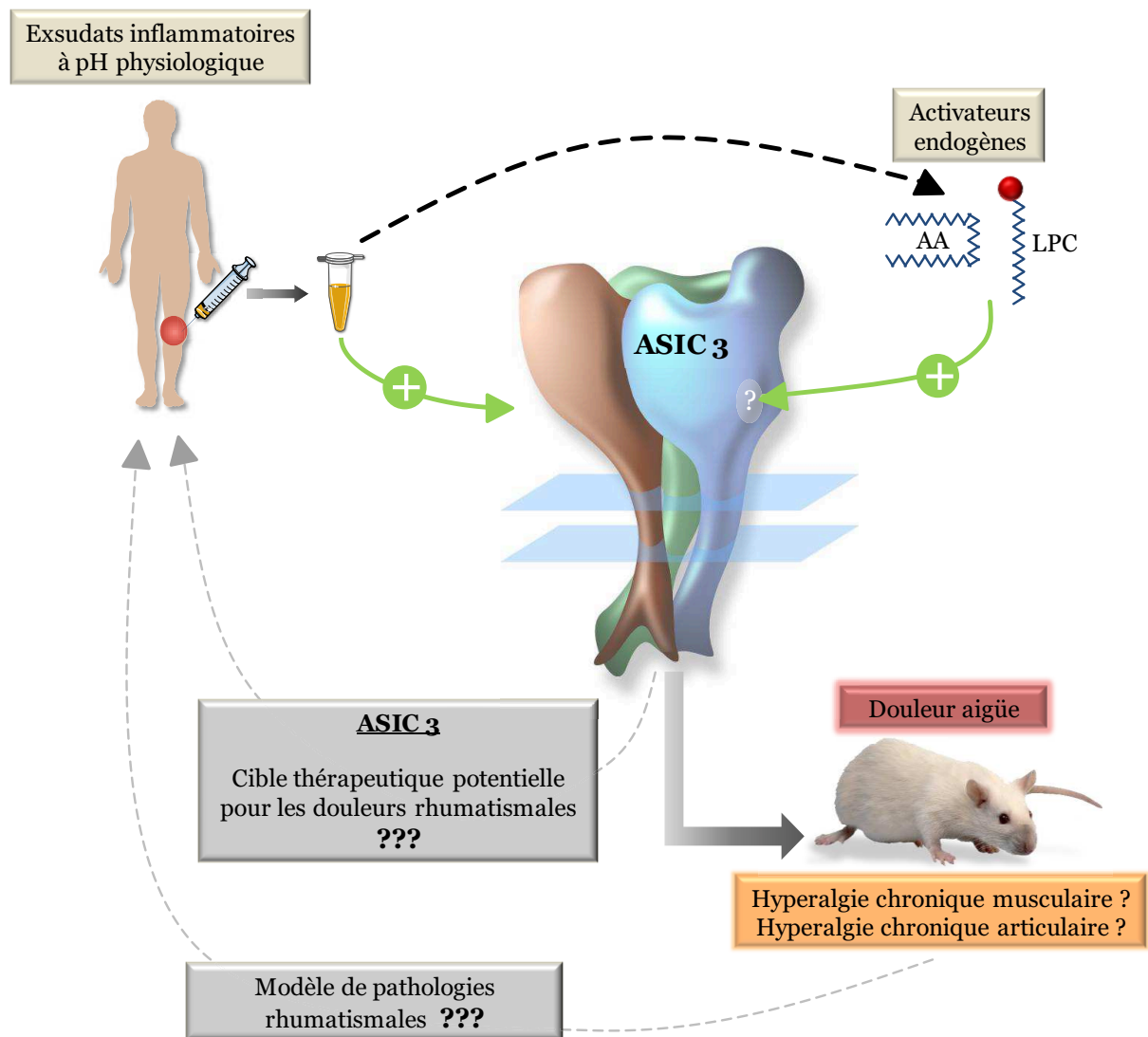


Figure 27 : Résumé graphique de l'article

2. Article

« Non-acidic activation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 3 by lipids »

Sébastien Marra, Romain Ferru-Clément, Véronique Breuil, Anne Delaunay, Marine Christin, Valérie Friend, Stéphane Seville, Christian Cognard, Thierry Ferreira, Christian Roux, Liana Euller-Ziegler, Jacques Noël, Eric Lingueglia* & Emmanuel Deval*

Non-acidic activation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 3 by lipids

Sébastien Marra^{1,2,3}, Romain Ferru-Clément^{4,5}, Véronique Breuil⁶, Anne Delaunay^{1,2,3}, Marine Christin^{1,2,3}, Valérie Friend^{1,2,3}, Stéphane Sebille^{4,5}, Christian Cognard^{4,5}, Thierry Ferreira^{4,5}, Christian Roux⁶, Liana Euler-Ziegler⁶, Jacques Noel^{1,2,3}, Eric Lingueglia^{1,2,3,†} & Emmanuel Deval^{1,2,3,*†}

Abstract

Extracellular pH variations are seen as the principal endogenous signal that triggers activation of Acid-Sensing Ion Channels (ASICs), which are basically considered as proton sensors, and are involved in various processes associated with tissue acidification. Here, we show that human painful inflammatory exudates, displaying non-acidic pH, induce a slow constitutive activation of human ASIC3 channels. This effect is largely driven by lipids, and we identify lysophosphatidylcholine (LPC) and arachidonic acid (AA) as endogenous activators of ASIC3 in the absence of any extracellular acidification. The combination of LPC and AA evokes robust depolarizing current in DRG neurons at physiological pH 7.4, increases nociceptive C-fiber firing, and induces pain behavior in rats, effects that are all prevented by ASIC3 blockers. Lipid-induced pain is also significantly reduced in ASIC3 knockout mice. These findings open new perspectives on the roles of ASIC3 in the absence of tissue pH variation, as well as on the contribution of those channels to lipid-mediated signaling.

Keywords acid-sensing ion channels; arachidonic acid; lysophosphatidylcholine; pain; sodium channels

Subject Categories Membrane & Intracellular Transport; Neuroscience

DOI 10.15252/emboj.201592335 | Received 18 June 2015 | Revised 7 December 2015 | Accepted 7 December 2015

Introduction

Acid-sensing ion channels (ASICs) are depolarizing sodium channels formed by the trimeric association of different subunits numbered from ASIC1 to ASIC3 (for review, see Deval *et al.*, 2010). They are gated by extracellular protons (Waldmann *et al.*, 1997) and are widely expressed throughout the nervous system where they

have been involved in different physiological and pathophysiological processes (for reviews, see Noël *et al.*, 2010; Wemmie *et al.*, 2013). Among these processes, pain is particularly interesting since an increasing amount of data identifies ASICs as promising therapeutic targets for the development of new analgesic strategies (Mazzuca *et al.*, 2007; Deval *et al.*, 2008, 2011; Karczewski *et al.*, 2010; Bohlen *et al.*, 2011; Walder *et al.*, 2011; Diochot *et al.*, 2012, 2015; Izumi *et al.*, 2012).

ASICs are basically considered as fine sensors of extracellular pH variations, and proton is actually the only endogenous ligand known to directly activate these channels. A non-proton ligand-sensing domain has also been described in ASIC3 (Yu *et al.*, 2010), which contributes to the direct effect of the synthetic compound GMQ (2-guanidine-4-methylquinazoline) and of the arginine metabolite agmatine (Li *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010). However, agmatine has a very low affinity for the channel (EC₅₀ ~10 mM), suggesting that it is probably not a direct endogenous activator of ASIC3, but rather a physiological modulator of the acid-evoked current. Several other stimuli linked to ischemia and/or inflammation have also been reported to potentiate the acid-induced ASIC3 current, including lactate (Immke & McCleskey, 2001), arachidonic acid (Allen & Attwell, 2002; Smith *et al.*, 2007; Deval *et al.*, 2008), nitric oxide (Cadiou *et al.*, 2007), hypertonicity (Deval *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010), serotonin (Wang *et al.*, 2013), and ATP (Birdsong *et al.*, 2010).

We show here that human painful inflammatory exudates that exhibit a physiological non-acidic pH are able to activate ASIC3 channels and that this effect is largely supported by lipids. Lysophosphatidylcholine (LPC) and arachidonic acid (AA), which are co-released following hydrolysis of membrane phospholipids by phospholipase A₂ (PLA₂) enzymes, are present at high concentrations in these exudates and can directly activate ASIC3 channels at physiological pH 7.4, that is, without any extracellular acidification. LPC is also a strong potentiator of the acid-induced ASIC3 current, similarly to what has been shown for AA (Deval *et al.*, 2008). The

1 CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC), UMR 7275, Valbonne, France

2 Université de Nice Sophia Antipolis, UMR 7275, Valbonne, France

3 LabEx Ion Channel Science and Therapeutics, Valbonne, France

4 CNRS, Laboratoire de Signalisation et Transports Ioniques Membranaires (STIM), ERL 7368, Poitiers Cedex 9, France

5 Université de Poitiers, ERL 7368, Poitiers Cedex 9, France

6 CHU-Nice, Hôpital l'Archet 1, Nice, France

*Corresponding author. Tel: +33493953418; E-mail: deval@ipmc.cnrs.fr

†These authors contributed equally to this work

combination of LPC and AA forms a potent endogenous signal that induces firing in nociceptive C-fibers and triggers pain responses in animals through an ASIC3-dependent mechanism. These results illustrate the capacity of endogenous lipids to effectively activate ASIC3 *in vitro* and *in vivo*, in the absence of any extracellular pH variations to generate pain in rodents and also probably in humans.

Results

Non-acidic painful human inflammatory exudates activate ASIC3 channels

Several studies have reported a role for ASIC3 in mediating pain in animal models of joint inflammation (Ikeuchi *et al*, 2008; Izumi *et al*, 2012; Sugimura *et al*, 2015). We thus tested the effect of crude human inflammatory exudates, collected from patients with joint effusions, on human ASIC3 channels expressed in HEK293 cells (Fig 1). Interestingly, exudates were not acid and two had a pH close to 7.4 (exudates #2 and #13 with pH values of 7.45 ± 0.02 and 7.49 ± 0.01 , respectively, see Fig EV1), although the visual analog scale (VAS) for pain was elevated in patients (8/10 and 9/10 for patients #2 and #13, respectively, see Fig EV1). Extracellular applications of these exudates on cells expressing human ASIC3 induced a slow sustained current, but not in non-transfected cells nor in cells expressing human ASIC1a (Fig 1A–C). The exudate-induced current reversed at +59 mV (Fig 1D) and was substantially inhibited by the ASIC3 blocker APETx2 (Diochot *et al*, 2004) (Fig 1E), confirming the direct activation of human ASIC3 channels in the absence of extracellular acidification. Chelating lipids in these exudates with bovine serum albumin (BSA, see Materials and Methods) significantly decreased their efficiency to activate human ASIC3 current (Fig 1F). Analysis of the total fatty acids (FAs) content of exudates from patients #2 and #13, by transmethylation and gas chromatography experiments (Fig 1G), revealed high levels of palmitic acid (16:0), oleic acid (18:1), stearic acid (18:0), and arachidonic acid (20:4/AA), with concentrations estimated to 441 ± 43 , 914 ± 129 , 200 ± 27 and 148 ± 42 μM , respectively. As these FAs could be either free or esterified into complex lipids such as phospholipids, we also performed mass spectrometry experiments

(Fig 1G, inset) that notably revealed high levels of lysophosphatidylcholine (LPC) in exudates (average concentrations estimated to 113 ± 14 , 26 ± 3 , 47 ± 6 and 14 ± 1 μM for LPC16:0, LPC18:1, LPC18:0, and LPC20:4, respectively, data from 11 patients, see Fig EV1). High contents of LPC have been similarly reported in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis (Fuchs *et al*, 2005). Together, these data indicate that painful human inflammatory exudates with a physiological pH close to 7.4 are able to activate a constitutive current generated by human ASIC3 channels and that lipids are involved in this effect.

Arachidonic acid (AA) and lysophosphatidylcholine (LPC) activate ASIC3 at pH 7.4

We next tested the effects of the different lipids on ASIC3 channels. The fatty acid AA (20:4, $\omega 6$) was already known to strongly potentiate the acid-induced ASIC3 currents (Smith *et al*, 2007; Deval *et al*, 2008; Delaunay *et al*, 2012). We show here that AA (10 μM) was also able to activate a slow sustained ASIC3 current at pH 7.4 (Fig 2A), that is, in the absence of extracellular acidification. In contrast, palmitic acid (16:0 at 10 μM), stearic acid (18:0, 10 μM), or oleic acid (18:1 at 10 μM) failed to activate a similar current when applied at pH 7.4 on cells transfected with human ASIC3 (Fig 2A). Because we also found high levels of LPC in exudates (Fig 1G, inset), we tested the effect of this lysophospholipid on human ASIC3 current at resting pH 7.4. We found that LPC16:0, LPC18:0, or LPC18:1 (10 μM each) had potent activating effects (Fig 2A), and the most efficient activation was obtained with LPC16:0 and LPC18:1. In good agreement with these results, LPC16:0 and LPC18:1 also activated a slow sustained current when applied at pH 7.4 on cells transfected with rat ASIC3, whereas palmitic acid, oleic acid, or phosphatidylcholine containing both palmitic and arachidonic acid (PC 16:0/20:4) had no effect (Fig 2B). Activation of rat ASIC3 by LPC16:0 and LPC18:1 was comparable, while LPC10:0 or LPC18:0 had a much smaller effect (see Fig EV2). We next tested the effect of crude LPC extracted from bovine brain, which mainly contains a mix of LPC16:0, LPC18:0, and LPC18:1 (Fig 2C–E). Crude brain LPC at 10 μM also activated a current at resting pH 7.4 in different cell lines transfected with rat ASIC3, but not in non-transfected cells (F-11, HEK293, and CHO cells, Figs 2C,

Figure 1. Non-acidic human inflammatory exudates activate recombinant human ASIC3 channels.

- Whole-cell recording experiments performed at -80 mV showing that extracellular application of joint exudate from patient #2 (ex#2, pH = 7.45 ± 0.02) activates an inward sustained current in HEK293 cells transfected with human ASIC3 channels (hA3), but not in non-transfected cells (NT). Functional expression of hA3 is shown by the presence of a typical current in response to extracellular acidification (from pH 7.4 to pH 6.6, insets).
- Effect of exudate from patient #13 (ex#13, pH = 7.49 ± 0.01) on HEK293 cells expressing either human ASIC3 or ASIC1a channels (insets: currents induced by extracellular acidification from pH 7.4 to pH 6.6).
- Histograms showing the mean amplitudes of exudate-induced currents (ex#2 and ex#13) measured from hASIC3 ($n = 9$), hASIC1a ($n = 5$), or non-transfected cells ($n = 5$) as illustrated in (A) and (B) (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, Kruskal–Wallis test followed by a Dunn's *post hoc* test; error bars indicate \pm SEM).
- Current–voltage relationship of the exudate-induced current (ex#2) as shown in (A). The current reverses at +59 mV (inset: current traces recorded at different voltages and at pH 7.4).
- Effect of APETx2 on ex#2-induced current. The dashed line indicates the zero current level (difference between recordings is due to inhibition by APETx2 of the human ASIC3 alkaline-activated current already present at pH 7.4 (Delaunay *et al*, 2012)).
- Mean amplitude of the hASIC3 currents induced by either the crude exudate from patient #13 or its delipidated fraction ($n = 6$ for each condition, ** $P < 0.01$, Mann–Whitney *U*-test; error bars indicate \pm SEM).
- Left panel: Typical chromatography (GC) analysis of human inflammatory exudate from patient #13 showing the presence of different fatty acids. Right panel: Estimated mean concentrations of palmitic (16:0), oleic (18:1), stearic (18:0), and arachidonic (20:4) acids in exudates from patients #2 and #13 ($n = 2$ for each fatty acid). Inset shows the estimated mean concentrations of different LPC species (LPC16:0, LPC18:1, LPC18:0, and LPC 20:4) obtained following MS analysis of exudates from 11 patients ($n = 11$ for each LPC, see also Fig EV1). Error bars indicate \pm SEM.

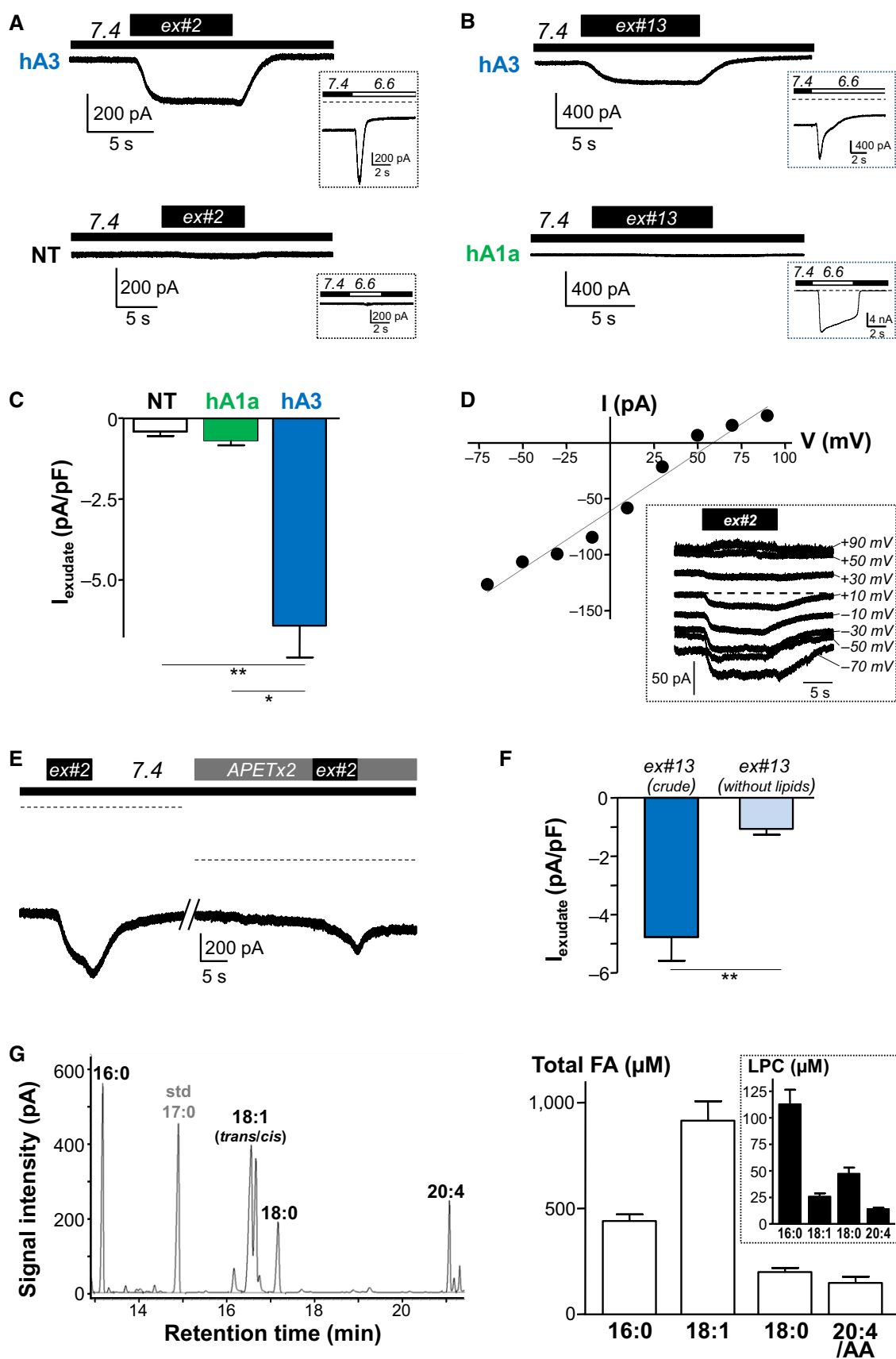


Figure 1.

Figure 2. Effect of fatty acids and lysophosphatidylcholine on recombinant ASIC3 channels.

Whole-cell recordings obtained at -80 mV from HEK293 and F-11 cells expressing either the human or the rat ASIC3 channels (hA3 or rA3) and from non-transfected cells (NT). The number of experiments (n) is indicated above each bar graph and error bars represent \pm SEM.

- A Extracellular applications of different fatty acids (20:4/AA, 16:0, 18:0, and 18:1) and lysophosphatidylcholine (LPC16:0, LPC18:0, and LPC18:1) at 10 μ M and at pH 7.4 on HEK293 cells expressing human ASIC3 channels (hA3). Histograms that represent the statistical analysis of data are shown in bottom panel, and current densities are measured following 30-s applications of fatty acids or 10-s applications of LPC ($*P < 0.05$ and $***P < 0.001$, Kruskal–Wallis test followed by a Dunn's *post hoc* test; $****P < 0.001$ as compared to effects of the respective fatty acids).
- B Comparison of the effects of palmitic acid (16:0, 10 μ M), oleic acid (18:1, 10 μ M), LPC16:0 (10 μ M), LPC18:1 (10 μ M), and phosphatidylcholine (PC) 16:0/20:4 (10 μ M) on HEK293 cells expressing rat ASIC3 channels. Current densities are measured following 30-s applications of fatty acids (16:0, 18:1), or 10-s applications of LPC, in the extracellular medium at resting pH 7.4. Typical current trace and statistical analysis of data are shown on the top and bottom, respectively ($*P < 0.05$ and $**P < 0.01$, Kruskal–Wallis test followed by a Dunn's *post hoc* test).
- C Crude LPC extracted from bovine brain elicits a current on F-11 cells expressing rat ASIC3 channels but not on non-transfected cells. Current densities are measured following 30-s applications of 10 μ M LPC at resting pH 7.4 ($**P < 0.01$, Mann–Whitney *U*-test).
- D Dose-dependent activation of rat ASIC3 channels by crude LPC in HEK293 cells. ASIC3 current densities are measured at resting pH 7.4, following extracellular applications (20 s) of different concentrations of LPC. Inset shows the dose–response curve of the activating effect of LPC fitted with a Boltzmann (IC_{50} estimated at 4.3 μ M).
- E Effects of different lysophospholipids (10 μ M each) applied extracellularly for 20 s at resting pH 7.4 on HEK293 cells expressing or not rat ASIC3 channels (rA3 or NT, respectively). Left panel: Typical current traces recorded from ASIC3-transfected cells upon application of lysophosphatidic acid (LPA, upper left) and lysophosphatidylcholine (LPC, lower left). Right panel: Bar graph representing the mean current densities measured following application of LPA, lysophosphatidylethanolamine (LPE), lysophosphatidylserine (LPS), LPC, or lysophosphatidylinositol (LPI) ($***P < 0.001$ as compared to NT, Mann–Whitney *U*-test). Inset shows the effect of LPC 10 μ M at resting pH 7.4 on cells transfected with either rat ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a or ASIC3 channels, or on non-transfected (NT) cells ($*P < 0.05$ and $**P < 0.01$, Kruskal–Wallis test followed by a Dunn's *post hoc* test).

2D–E, and EV3, respectively). The activation of ASIC3 by LPC was observed for concentrations > 1 μ M, with an estimated EC_{50} of 4.3 μ M (Fig 2D). Hydrolysis of membrane phospholipids by PLA_2 enzymes leads to the release of different lysophospholipids, including LPC, but also lysophosphatidylethanolamine (LPE), lysophosphatidylserine (LPS), lysophosphatidylinositol (LPI), and lysophosphatidic acid (LPA). LPC was the only lysophospholipid able to significantly activate an ASIC3 current at resting pH 7.4 (Fig 2E). Moreover, the activating effect of LPC was specific for ASIC3 channels since it failed to induce a similar current in cells expressing either ASIC1a, ASIC1b, or ASIC2a channels (Fig 2E, inset). Together, these data indicate that individual application of micromolar (> 1 μ M) concentrations of LPC (and most probably also AA), in the extracellular medium and at resting pH 7.4, led to the activation of ASIC3 channels in a slow and sustained manner. The most potent activation was obtained with LPC16:0 and LPC18:1, showing the importance for the effect of the amphipathic properties of LPC molecules and of the length of their lipid chain.

LPC also potentiates the acid-induced ASIC3 current and it acts by shifting the pH dependence of the channel

To further explore the mechanism of action of lipids on ASIC3, we tested the effect of LPC on its acid-induced current. In addition to the activating effect at resting pH 7.4 (Fig 3A, I_{basal}), LPC (10 μ M) also strongly potentiated the pH 7.0-induced ASIC3 current (Fig 3A). The effect started immediately after its application on the extracellular side of the cells and reached a maximum after 3 min (Fig 3A, bottom panel). Although submicromolar concentrations of LPC did not activate ASIC3 channels at pH 7.4 (Fig 2D), they potentiated the acid-induced ASIC3 current (Fig 3B, inset). The potentiating effect was reversible upon washout (Fig 3B, inset) and was clearly dependent on LPC extracellular concentration. However, the EC_{50} was not calculated because it was not possible to reach the maximal effect. The efficacy of different lysophospholipids to modulate the pH 7.0-induced ASIC3 current was also tested on transfected cells (see Fig EV4). LPC had the strongest potentiating effect with a \sim fivefold

increase of the pH 7.0-activated ASIC3 peak current while LPA and LPE had no significant effects. LPS and LPI also displayed a significant but much smaller potentiating effect, with ~ 1.6 -fold increases for both lysophospholipids. LPC acted on the channel by shifting its pH-dependent activation curve toward more alkaline pH values, with no effect on inactivation (Fig 3C), leading to an increase of the ASIC3 window current (Fig 3D), similarly to the effect we previously described for AA (Deval *et al*, 2008). As a result, LPC is not only a strong potentiator of the acid-induced ASIC3 current, but it also generates a small but constitutive ASIC3 current at resting physiological pH 7.4, that is, in the absence of any extracellular acidification.

These data demonstrate that LPC is the most efficient lysophospholipid acting on ASIC3 channels. It induces an alkaline shift of the pH-dependent activation curve, leading to (i) a strong potentiating effect on the acid (pH 7.0)-induced current and (ii) activation of a constitutive current at physiological pH 7.4.

Interaction between lipids and ASIC3 channels

The effects of LPC on ASIC3 channels could be either direct or indirect, because of lysophospholipid insertion into the external leaflet of the plasma membrane and subsequent non-symmetrical membrane deformation. We therefore tested the effects of another amphipathic molecule known to modify the cell shape (Sheetz & Singer, 1974), that is, the crenator trinitrophenol (TNP), which preferentially inserts into the external leaflet of the bilayer. As expected, TNP-induced strong modifications of cell surfaces as shown by experiments of scanning ion conductance microscopy (Fig 4A; left panel, average roughness of membranes of 0.21 ± 0.10 μ m vs. 0.12 ± 0.04 μ m in control conditions, $n = 30$ cells, $P < 0.01$). On the other hand, TNP was not able to activate a significant ASIC3 current at resting pH 7.4 (Fig 4A, right panel). The TNP-induced membrane modifications observed here were typical “crenations”, with sizes similar to those previously observed by electron microscopy (Sheetz *et al*, 1976). Conversely, extracellular application of LPC or AA, which actually both activated significant ASIC3 currents

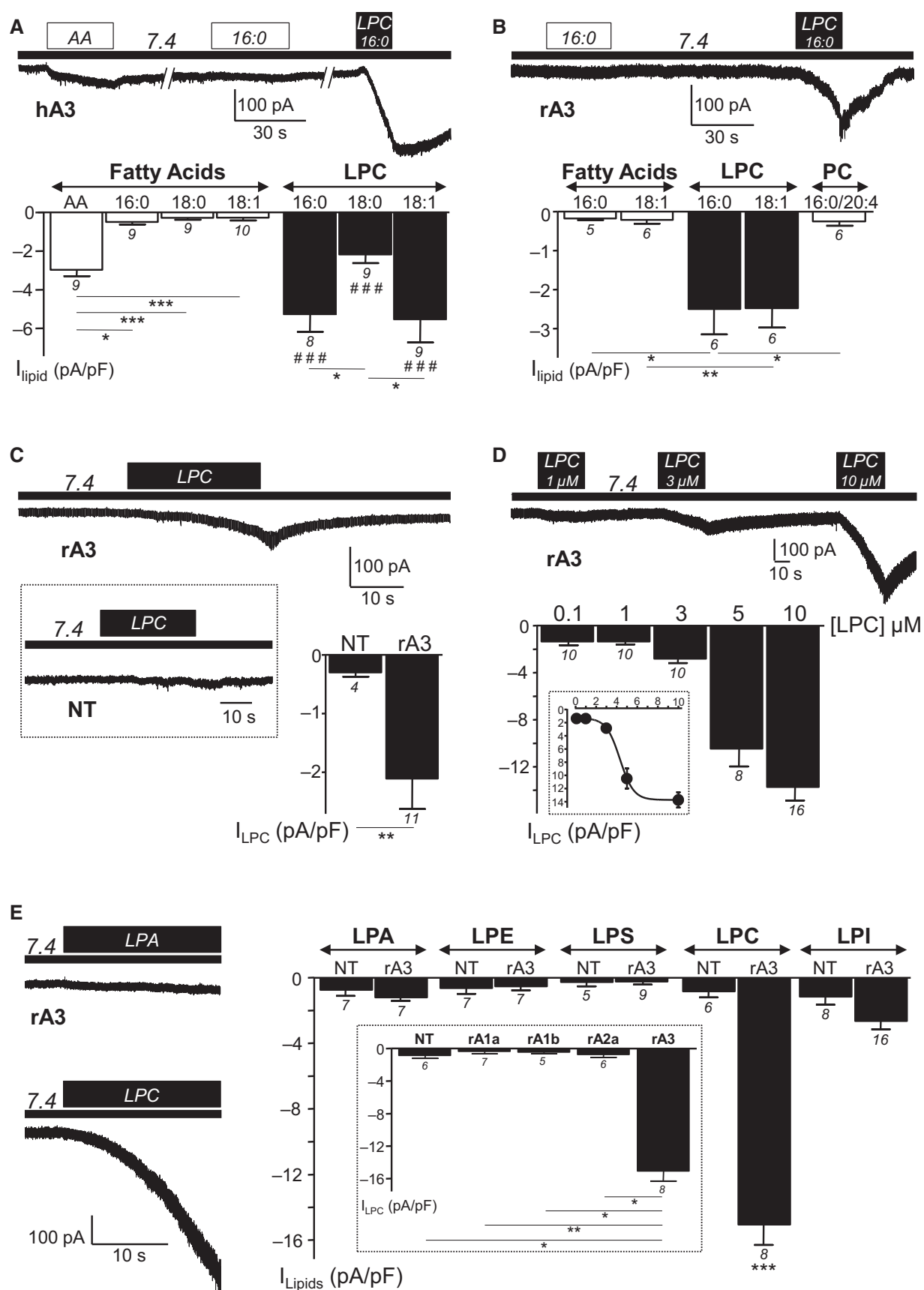


Figure 2.

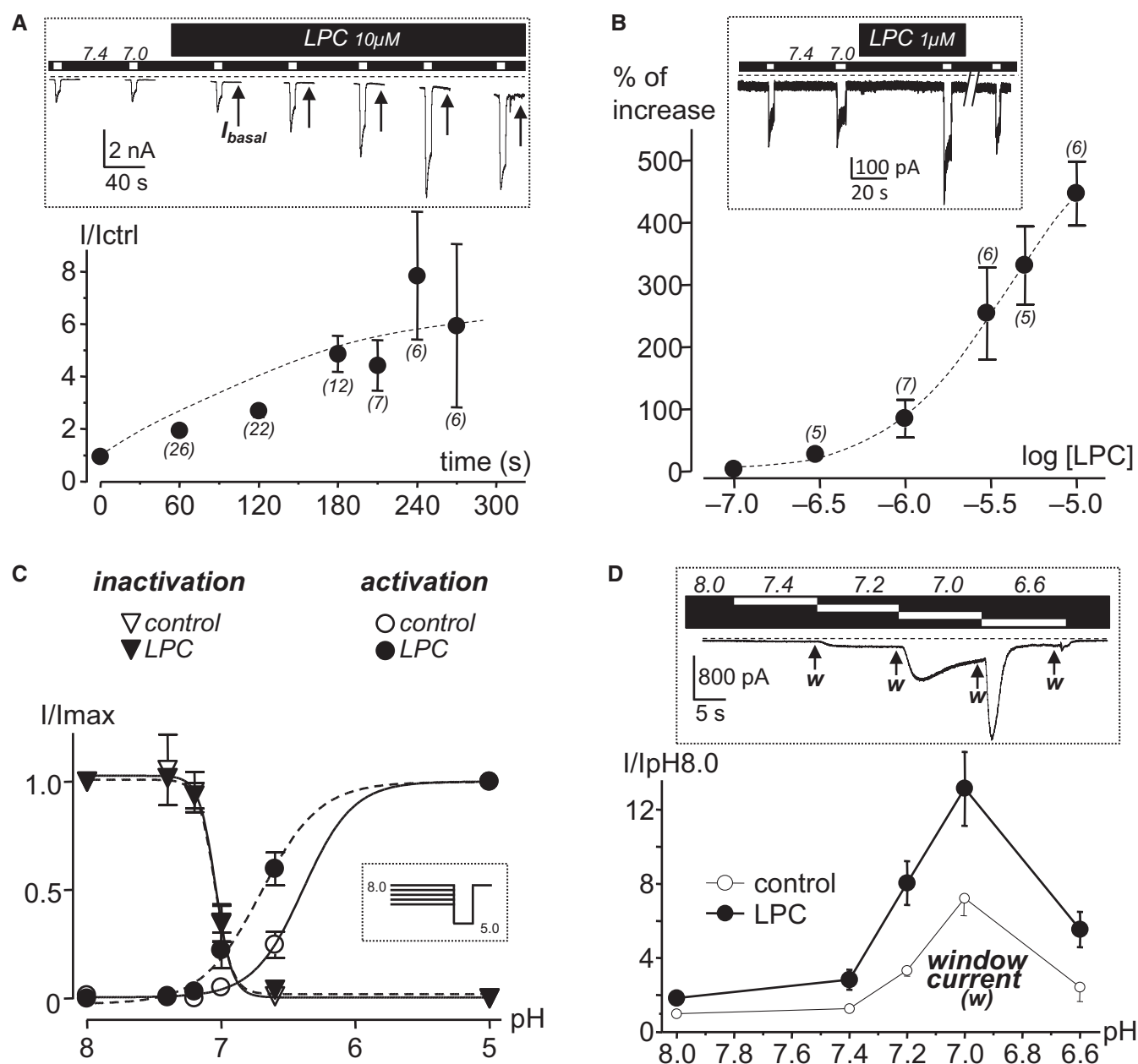


Figure 3. LPC activates ASIC3 channels at pH 7.4 and potentiates its acid-induced activity.

Effects of crude LPC extracted from bovine brain on HEK293 and F-11 cells expressing the rat ASIC3 channels. LPC is applied extracellularly in the pH 7.4 bathing solution, and data are obtained from whole-cell patch-clamp experiments performed at -80 mV. The number of experiments (n) is indicated in brackets, dotted lines on traces represent the zero current level, and error bars indicate \pm SEM.

- A Effect of LPC (10 μ M) on pH 7.0-induced ASIC3 current represented as a function of time. Inset: typical recording illustrating the potentiating effect of LPC on the pH 7.0-induced current recorded in F-11 cells. The curve on the bottom represents current amplitudes measured after LPC application and normalized (I/I_{ctrl}) to those measured in control conditions, that is, before the application of lipid. Note the basal constitutive current induced by LPC at resting pH 7.4 (arrows, I_{basal}).
- B Dose-response effect of the potentiation by LPC of the pH 7.0-induced ASIC3 current obtained from HEK293-transfected cells. The percentage of effect is calculated by comparing current amplitudes before and after application of LPC. Inset: typical potentiating effect of LPC (1 μ M) on a pH 7.0-induced ASIC3 current showing reversibility upon washout. Note that this concentration is not sufficient to induce the basal constitutive current at pH 7.4 shown in (A).
- C Effect of LPC (10 μ M) on the pH-dependent activation and inactivation curves of ASIC3 channels expressed in F-11 cells. Acid-induced ASIC3 currents are normalized to their maximal peak amplitude measured at pH 5.0, and the protocol used to obtain the curves is shown in the inset (data from three different cells).
- D Effect of LPC (10 μ M) on the ASIC3 window current measured between pH 8.0 and pH 6.6 from HEK293 cells. Inset: typical current trace obtained in control condition with the arrows (w) indicating the different points at which the window current is measured. Amplitudes of the ASIC3 window current are measured in control condition (without LPC, data from 8 different cells) and after 30-s applications of LPC (data from 6 different cells). Current amplitudes, measured at different external pH in both control and LPC condition, are normalized to the basal current level measured at pH 8.0 without LPC (bottom graph).

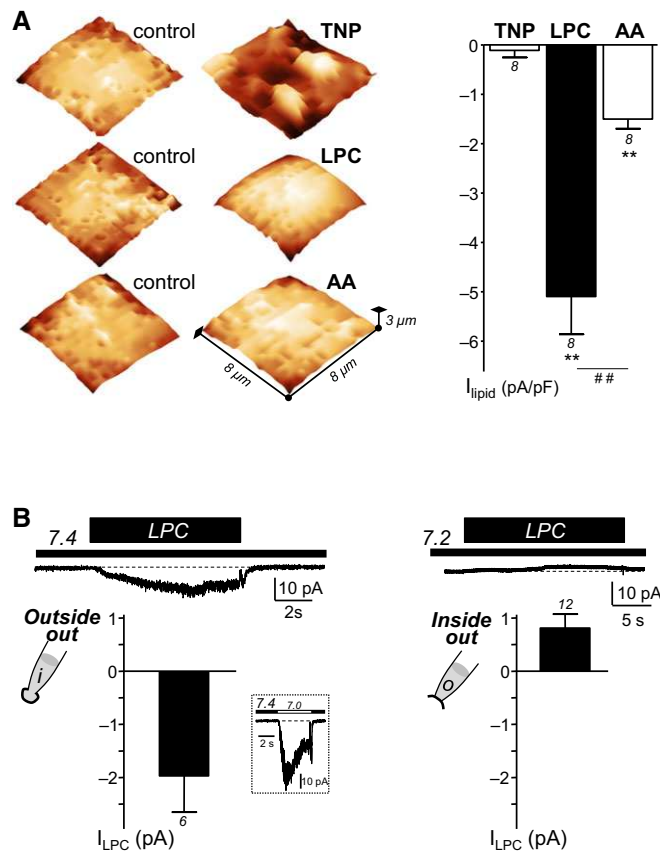


Figure 4. Effect of trinitrophenol (TNP), LPC, and AA on the cell membrane shape and ASIC3 channel activity at pH 7.4.

- A** Representative SICM experiments (left panel) performed on HEK293 cells showing the effects of the crenator trinitrophenol (TNP), of LPC (bovine brain extract) and of AA on the membrane shape (TNP at 5 mM, LPC at 30 μM and AA at 10 μM). SICM images are obtained before (control) and after extracellular application of TNP, LPC, or AA. Whole-cell recording experiments (right panel), performed at -80 mV, showing the corresponding effect of TNP (5 mM, 30-s applications), LPC (10 μM , 10-s applications), and AA (10 μM , 30-s applications) on rat ASIC3 channels at resting pH 7.4 (** $P < 0.01$, significant current induced at pH 7.4, and ## $P < 0.01$, Wilcoxon tests).
- B** Effect of LPC applied either intracellularly or extracellularly in excised patch-clamp experiments recorded from rat ASIC3-transfected F-11 cells. Outside-out (left panel) and inside-out (right panel) currents were recorded at -50 mV and $+50$ mV, respectively. Histograms show the mean amplitudes of the currents induced by LPC (10 μM) applied either at pH 7.4 (extracellular side, outside-out) or at pH 7.2 (intracellular side, inside-out). These two different pH values mimic the resting physiological pH of extracellular and intracellular media, respectively. For outside-out experiments, LPC-induced current amplitude is measured from patches that also displayed a typical ASIC3 inward current following extracellular acidification from pH 7.4 to pH 7.0 (inset). The dotted lines represent the basal current level.

Data information: The number of experiments (n) is indicated below or above each bar graph, and error bars represent \pm SEM.

at resting pH 7.4 (Fig 4A, right panel), did not induce any membrane deformation (Fig 4A, left panel; average roughness of membranes of 0.10 ± 0.02 μm for LPC and 0.12 ± 0.04 μm for AA as compared to 0.12 ± 0.04 μm in control conditions, $n = 30$ cells, $P > 0.05$). Figure 4A (right panel) also shows that the activation of

ASIC3 was more important with LPC than with AA. Furthermore, we also show that the activation of ASIC3 by LPC at pH 7.4 occurred in the outside-out patch-clamp configuration, when the lipid was applied to the extracellular side of the membrane (Fig 4B, left panel). In contrast, no inward ASIC3 current was recorded in the inside-out patch-clamp configuration (Fig 4B, right panel), when the lipid was applied to the intracellular side of the membrane. Smith and colleagues reported a potentiating effect of AA on the acid-induced ASIC2a current from both sides of the membrane (Smith *et al*, 2007). Difference between these results and our data could suggest differential mechanisms of action of AA and LPC on ASICs. However, both works cannot be readily compared because (i) the channel subtypes tested in excised patch-clamp experiments are different (ASIC3 vs. ASIC2a) and (ii) the activating effect of LPC at resting pH 7.4 was not tested in the work of Smith and colleagues. Consistently, we did not observe any activation of rat ASIC2a channel following application at physiological pH 7.4 of LPC (see Fig 2E, inset) or co-application of LPC and AA (see Fig 5B).

Altogether, these results suggest that the effects of LPC and AA on ASIC3 channels are probably not due to an indirect mechanical deformation of the plasma membrane, but rather to a more direct effect of the lipid on the extracellular side of the channels.

The combination of LPC and AA strongly activates ASIC3 channels without any extracellular acidification

Lysophosphatidylcholine and arachidonic acid are co-released following hydrolysis of cell plasma membrane by PLA₂ enzymes. We therefore tested the co-application of both lipids on the ASIC3 channels activity at pH 7.4 (Fig 5). LPC and AA activated a stronger ASIC3 current than LPC alone (Fig 5A). This effect was specific of ASIC3 channels, since we did not observe any significant current on cells transfected with ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, or ASIC2b subunits following co-applications of LPC16:0 + AA at pH 7.4 (Fig 5B). A voltage ramp protocol was then used before and during application of lipids to measure the reversal potential of the current activated by LPC16:0 + AA in ASIC3-transfected cells (Fig 5C). The lipid-activated current had a reversal potential estimated to be close to $+60$ mV, indicating that it is mainly carried by Na⁺ ions, and it was significantly inhibited by the ASIC3-inhibitory peptide APETx2 (Fig 5D). These data demonstrate that ASIC3 can specifically integrate endogenous lipid signals produced by hydrolysis of the membrane phospholipids in the absence of extracellular pH variations.

LPC and AA constitute a lipid signal that activates native ASIC3 channels and produces pain in rodents

To test the relevance of the activation of ASIC3 by lipids at resting pH 7.4 in a context of native ASIC3 channels, LPC and AA were co-applied at pH 7.4 to rat dorsal root ganglia (DRG) neurons. Co-application of both lipids induced a constitutive current, which was largely prevented or inhibited by the non-selective ASIC blocker amiloride (Fig 6A). The native lipid-induced current was observed in 11 out of 25 neurons (44%, see Fig 6B, inset), corresponding to small and medium diameter neurons (8 and 3 cells, respectively) that all displayed an acid (pH 6.6)-induced ASIC current (ASIC⁺ neurons). Lipid-induced current was also sensitive to the ASIC3 inhibitory peptide APETx2 (Fig 6B, lower panel). Similarly to what

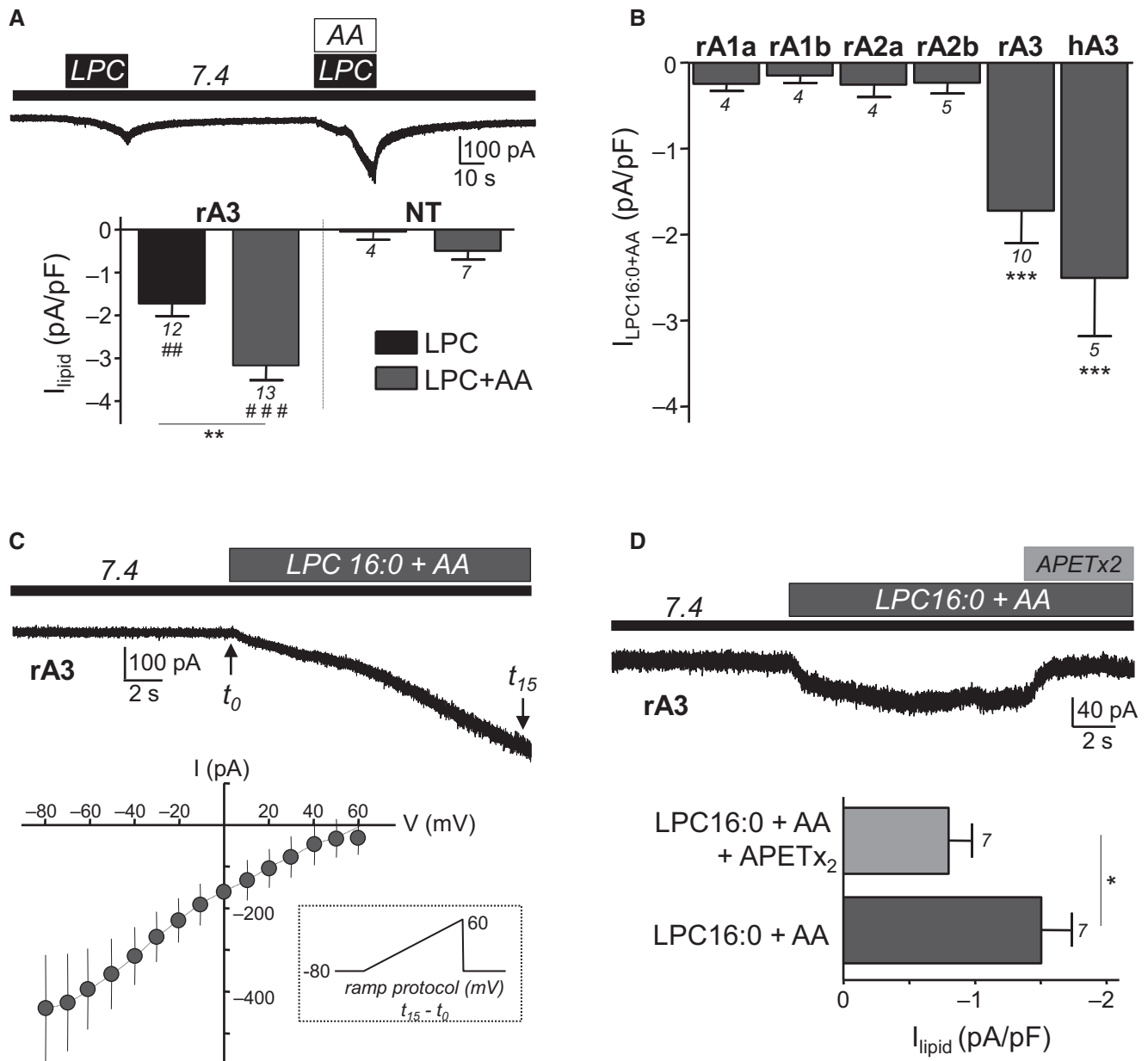


Figure 5. LPC and AA act together to specifically activate ASIC3 at physiological pH 7.4.

- A** Whole-cell recording experiments at -80 mV and showing that co-application of LPC (bovine brain extract) and AA ($10 \mu\text{M}$ each) at pH 7.4 results in a stronger activation of the rat ASIC3 current in transfected F-11 cells, as compared to the effect of LPC alone (** $P < 0.05$, Mann–Whitney U -test; ### $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$, significantly different from non-transfected (NT) cells, Mann–Whitney U -tests).
- B** Effect of a co-application of LPC and AA on different ASIC channel subtypes expressed in transfected F-11 cells. Extracellular application of both lipids during 20 s (LPC16:0 + AA, $10 \mu\text{M}$ each) at resting pH significantly activates rat and human ASIC3 channels but not rat ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, or ASIC2b channels (*** $P < 0.001$, significantly different as compared to the effect of AA + LPC on non-transfected cells shown in A, Kruskal–Wallis test followed by a Dunn's *post hoc* test).
- C** Current–voltage relationship of the rat ASIC3 current induced by extracellular application of LPC16:0 + AA ($10 \mu\text{M}$ each, data from 9 different cells). Voltage ramp protocols (inset) were imposed to the cells for 10 ms before (t_0) and after (t_{15}) a 15-s application of both lipids (see current trace at the top). The lipid-induced ASIC3 current is obtained as the difference between t_{15} and t_0 currents, and the estimated reversal potential is near $+60$ mV.
- D** Effect of the ASIC3 inhibitory peptide APETx2 ($1 \mu\text{M}$) on the current induced by co-application of LPC16:0 and AA ($10 \mu\text{M}$ each) at pH 7.4 on ASIC3-transfected cells (* $P < 0.05$, Wilcoxon test).

Data information: The number of experiments (n) is indicated below or right of each bar graph, and error bars represent \pm SEM.

we observed on primary cultures of DRG neurons, nerve-skin experiments showed that co-application of lipids (LPC16:0 + AA) to the peripheral endings of rat C-fibers provoked a significant increase of

action potential (AP) firing, which was prevented when lipids were co-applied together with amiloride (Fig 6C). Furthermore, the *in vivo* injections of LPC16:0 + AA to the dorsal face of rat hindpaws

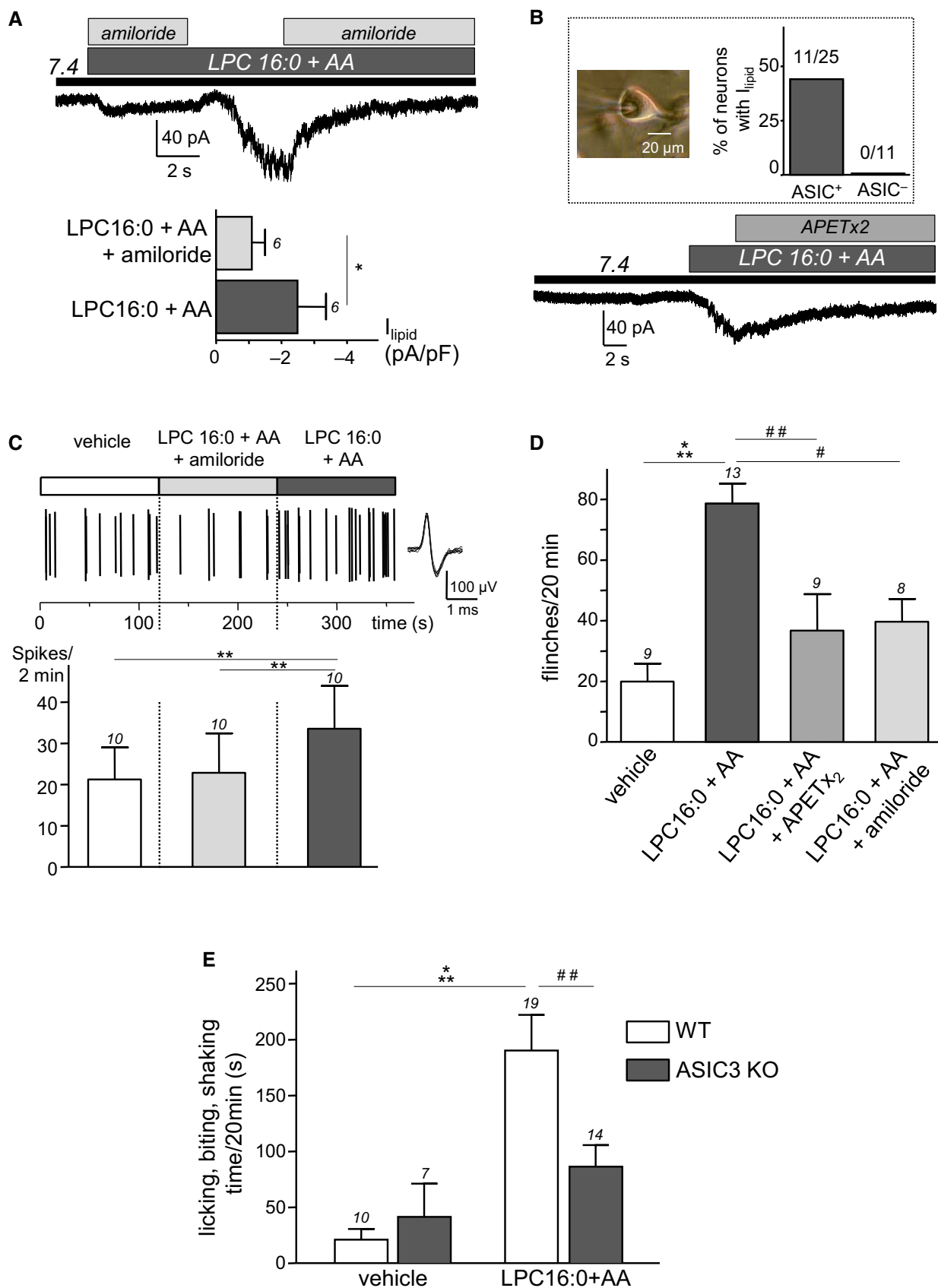


Figure 6.

Figure 6. LPC and AA activate native ASIC channels in DRG neurons and increase C-fibers firing and pain behavior through an ASIC3-dependent mechanism.

- A Effect of amiloride (1 mM) on native whole-cell currents recorded at -80 mV and induced by the co-application of LPC and AA (10 μ M each) at pH 7.4 on rat DRG neurons ($^*P < 0.05$, Wilcoxon test).
- B Typical inhibitory effect of APETx2 (1 μ M) on the lipid-induced (LPC16:0 + AA) current recorded at pH 7.4 from rat DRG neurons. Inset: percentage of DRG neurons (picture, scale bar = 20 μ m) responding to lipids and that displayed (ASIC⁺) or do not displayed (ASIC⁻) a pH 6.6-induced ASIC current.
- C Nerve-skin experiments showing the effect of lipids (LPC16:0 + AA, 48 nmole each), applied for 2 min onto the receptive fields of C-fibers in the skin, either with amiloride (1 mM) or alone. Top trace shows a typical recording of C-fiber firing with an enlarged action potential (AP) on the right, while the average spike frequency is represented at the bottom. Lipids provoke an increase of AP firing, which is blocked when co-applied with amiloride ($^{**}P < 0.01$ for LPC16:0 + AA vs. vehicle and LPC16:0 + AA vs. LPC16:0 + AA + amiloride, Friedman test followed by a Dunn's *post hoc* test).
- D Pain behavioral experiments showing the number of rat flinches induced by a hindpaw injection of LPC16:0 + AA (2.4 nmole each) or vehicle (0.24% ethanol). Lipids are injected either alone or in the presence of APETx2 (0.2 nmole) or amiloride (20 nmole) ($^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$, Kruskal–Wallis test followed by Dunn's *post hoc* tests).
- E Lipid-induced pain in wild-type (WT) and ASIC3 knockout mice (ASIC3 KO). Lipids (LPC16:0 + AA, 4.8 nmole each) or vehicles (0.96% ethanol) are injected into a hindpaw, and the pain behavior is represented as the time spent by mice licking, biting, and shaking their injected paw for 20 min ($^{##}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$, two-way ANOVA tests followed by Bonferroni's *post hoc* tests).

Data information: The number of experiments (n) is indicated right of or above each bar graph, and error bars represent \pm SEM.

produced a significant pain behavior (flinches) as compared to injections of vehicle (Fig 6D). The lipid-induced pain was significantly reduced when the pharmacological inhibitors APETx2 or amiloride were co-injected together with LPC16:0 and AA in rats, strongly suggesting an involvement of ASIC3-containing channels in the observed effect. Finally, injections of LPC16:0 + AA into mouse hindpaws induced a pain behavior in wild-type animals that was significantly reduced in ASIC3 knockout mice (Fig 6E), further supporting the specificity of the effects with regard to ASIC3 channels.

Combination of these *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* results demonstrate that native ASIC3 currents in DRG neurons are also activated by lipids at physiological pH 7.4, increasing the firing rate of C-fibers and producing pain in rodents.

Discussion

ASIC channels are gated by extracellular protons and are considered as pH sensors. However, in addition to protons, several endogenous modulators of these channels have also been described. For instance, FMRFamide-related peptides have been reported to directly interact with ASICs to potentiate their activity (Askwith *et al*, 2000; Deval *et al*, 2003). ATP, lactic acid, arachidonic acid, agmatine, serotonin, and hypertonicity also enhance the proton-induced ASIC3 current (Immke & McCleskey, 2001; Smith *et al*, 2007; Deval *et al*, 2008; Birdsong *et al*, 2010; Li *et al*, 2010; Yu *et al*, 2010; Wang *et al*, 2013), supporting the idea that this channel behaves as a coincidence detector able to sense protons and several other endogenous stimuli. In addition, ASIC3 has been shown to be activated at physiological pH 7.4 by the synthetic compound GMQ (2-guanidine-4-methylquinazoline), and this effect involves a site in the channel different from the one identified for the effect of protons (Yu *et al*, 2010). This non-proton binding site has also been proposed to participate in the effect of the endogenous arginine metabolite agmatine (Li *et al*, 2010), and it is required for the paradoxical stimulation of ASIC3 by amiloride (Li *et al*, 2011). Finally, a toxin isolated from the Texas coral snake's venom, MitTx, is able to robustly activate ASIC1 channels (Bohlen *et al*, 2011), independently of protons. These data suggest the attractive possibility that endogenous stimuli can physiologically activate ASIC channels in the absence of any extracellular acidification.

Activation of ASIC channels by endogenous compounds in the absence of extracellular pH variations is further supported by our observation that non-acidic exudates from patients with painful joint effusions can activate recombinant ASIC3 channels *in vitro*. The activating effect is largely supported by lipids, which are present at high levels in the human exudates. We further identify lysophosphatidylcholine and arachidonic acid as activators of ASIC3 at resting pH 7.4. Extracellular acidification is therefore not the unique signal able to generate an ASIC activity, and lipids can also induce a slowly activating sustained ASIC3 current. Individually, LPC and AA act on the channel with similar kinetics, both shifting their pH dependence for activation toward more alkaline values. This effect leads to a strong potentiation of the pH-activated ASIC3 current (this work, but see also Deval *et al*, 2008) and, importantly, to a constitutive depolarizing ASIC3 current at resting physiological pH 7.4. LPC has a more potent activating effect than AA, most probably because of a stronger shift of the channel pH dependence. When applied together, LPC and AA have a cumulative effect on ASIC3 channels. As the two lipids are released simultaneously following hydrolysis of membrane phospholipids by PLA₂ (Murakami *et al*, 2011), this finding supports the idea that they represent an endogenous lipid signal able to trigger constitutive ASIC3 activity in the absence of extracellular pH variations. Such activation by lipids significantly extends the contribution of ASIC3 in pain sensing. At resting pH 7.4 and in the presence of lipids, ASIC3 can indeed behave as a background depolarizing channel, which sensitizes neurons toward other stimuli and/or could trigger long-lasting pain. On the other hand, lipids also strengthen the sensitivity of ASIC3 channels to extracellular pH acidifications, an effect that can greatly contribute to pain enhancement in conditions of tissue acidosis.

The constitutive ASIC3 current is activated by micromolar concentrations of AA and LPC (> 1 μ M), which correlate well with the levels of lipids (> 20 μ M) found in human exudates in the present study. LPC is particularly interesting because it has the strongest effect on ASIC3, which has never been described before, and because its role in pain remains poorly documented. Indeed, although LPC is known to indirectly induce peripheral neuropathy and pain through nerve demyelination (Wallace *et al*, 2003; Inoue *et al*, 2008), our data also support a more direct contribution to pain through an effect on the activity of ASIC3 channels. Moreover, high level of LPC (> 300 μ M) has been reported in human plasma

(Wiesner *et al*, 2009), and it is considered as a lipid second messenger involved in the pathogenesis of inflammatory diseases. For instance, both the plasma and the synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis are enriched with LPC-containing saturated fatty acid (Fuchs *et al*, 2005), in good agreement with our data showing a concentration of LPC16:0 greater than 50 μM in exudate of patient with a similar pathology. Effects of LPC on other pain-related channels have also been reported *in vitro*, on the thermal sensitivity of the TRPM8 cold/menthol receptor (Andersson *et al*, 2007), and on the potassium channel TREK-1 (Maingret *et al*, 2000). Interestingly, the tissue level of LPC rapidly increases following myocardial ischemia (Sedlis *et al*, 1993; Daleau, 1999), a pathological condition for which ASIC3 channels have been proposed to be the sensor of cardiac pain (Immke & McCleskey, 2001; Sutherland *et al*, 2001).

Lysophosphatidylcholine is the most effective lysophospholipid acting on ASIC3 (with a much lower effect of LPI and LPS, and no effect of LPA), showing the importance of the choline head, and suggesting some specificity in the effect. The fatty acid chain of LPC is also important since the activation of ASIC3 mainly occurs when the lysophospholipid contains palmitic acid (16:0) or oleic acid (18:1), which are the principal fatty acids that compose phosphatidylcholine in normal human brain (Svennerholm, 1968). On the other hand, the fatty acids 16:0, 18:0, or 18:1 are not able to activate ASIC3 channels, demonstrating that the amphipathic structure of LPC is necessary to produce the activation. Due to their abilities to insert into lipid bilayers, amphipathic molecules such as lysophospholipids or AA can be considered as compounds inducing membrane curvature changes according to the “bilayer couple theory” (Sheetz & Singer, 1974) and/or to their cone shapes (Pascher *et al*, 1992; Lundbaek & Andersen, 1994). The activating effects of LPA, LPC, and AA on the mechano-sensitive TREK/ TRAAK channels have been suggested to be the consequence of such membrane deformations (Maingret *et al*, 2000; Chemin *et al*, 2005; Brohawn *et al*, 2014). In the case of ASIC3, the activating mechanism appears to be different since trinitrophenol, which crenates cell membranes, failed to reproduce the effects of LPC or AA. Moreover, although ASIC3 has been involved in mechano-sensory processes (Price *et al*, 2001; Chen *et al*, 2002; Page *et al*, 2005; Fromy *et al*, 2012), the channel does not appear to be directly gated by mechanical stimulation (Drew *et al*, 2004). Even if it is difficult to definitely rule out whether the effect of LPC or AA on ASIC3 is an indirect consequence of changes in the plasma membrane physicochemical properties, we favor more direct activating mechanisms associated with accumulation of the two lipids onto, or in the close vicinity of the channel. However, LPC can also act via G-protein-coupled receptors (GPCRs, for review, see Meyer zu Heringdorf & Jakobs, 2007), and we cannot completely exclude a possible indirect activation of ASIC3 via such membrane receptors.

In conclusion, the present work reveals that LPC and AA constitutively activate ASIC3 channels expressed in peripheral sensory neurons in the absence of pH variations, leading to pain under resting pH conditions. This activation may have broader consequences than only pain, especially in humans where ASIC3 is more largely expressed than in rodents (Delaunay *et al*, 2012). The discovery of such endogenous lipid activators of ASIC3 at physiological pH opens new perspectives on the role of ASIC channels in both physiological

and pathophysiological processes that are not necessarily associated with extracellular pH variations.

Materials and Methods

F-11, CHO, and HEK293 cell cultures and transfection

F-11, CHO, and HEK293 cell lines were grown as described previously (Ettaiche *et al*, 2006). One day after plating, cells were transfected with pIRES2-rASIC1a-EGFP, pIRES2-rASIC1b-EGFP, pIRES2-rASIC2a-EGFP, pIRES2-rASIC2b-EGFP, pIRES2-rASIC3-EGFP, or pIRES2-hASIC3a-EGFP vectors using the JetPEI reagent according to the supplier's protocol (Polyplus transfection SA, Illkirch, France). Fluorescent cells were used for patch-clamp recordings 2–4 days after transfection.

Primary cultures of DRG neurons

Lumbar DRG neurons were dissected from adult male Wistar rats, enzymatically dissociated and maintained in primary culture as already described (Deval *et al*, 2008). The diameter of DRG neurons recorded in patch-clamp ranged between 12 and 32 μm , with an average of $24 \pm 1 \mu\text{m}$. Based on a classification where small, medium and large neurons have diameters $\leq 25 \mu\text{m}$, between 25 and 40 μm , and larger than 40 μm , respectively (Scroggs & Fox, 1992; Scholz *et al*, 1998; Molliver *et al*, 2005), we recorded 61% (22/36) of small neurons, 33% (12/36) of medium neurons and 6% (2/36) of large neurons.

Patch-clamp experiments

We used whole-cell and excised configurations of the patch-clamp technique to measure membrane currents (voltage clamp). Recordings were made at room temperature using an axopatch 200B amplifier (Axon Instruments) with a 2 kHz low-pass filter. Data were sampled at 10 kHz, digitized by a Digidata 1440 A-D/D-A converter (Axon Instruments) and recorded on a hard disk using pClamp software (version 10; Axon Instruments). For whole-cell and outside-out experiments, the patch pipettes (2–8 M Ω) contained (in mM) the following: 135 KCl, 2.5 Na₂-ATP, 2 MgCl₂, 2.1 CaCl₂, 5 EGTA, and 10 HEPES (pH 7.25 with KOH). The control bath solution contained (in mM) the following: 145 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, and 10 glucose (pH 7.4 with N-methyl-D-glucamine or NaOH). For inside-out experiments, the pipette and bath solutions were reversed. MES was used instead of HEPES to buffer solution pH ranging from 6.0 to 5.0, and ASIC currents were induced by shifting one out of eight outlets of the microperfusion system from a holding control solution (i.e., pH 7.4 or pH 8.0) to an acidic test solution.

SICM experiments

Scanning ion conductance microscopy (SICM) is a technique in which the ion current flowing into a nanopipette is used to control the vertical (z-axis) position of the pipette tip relative to the cell surface. Basic arrangement of the SICM for topographical imaging of living cells has previously been described (Korchev *et al*, 1997). To

scan sample, nanopipette probe was driven in the x- and y-directions by a piezo stage mounted on 25-mm translation stage DC motors. Information on the lateral and vertical positions was recorded and used to generate a three-dimensional (3D) topographic image (ScanIC Image software, Ionscope). In this study, we used the developed hopping mode of SICM (Novak *et al.*, 2009). The present instrument is based on an inverted optical microscope (Olympus IX70). Ionscope Ltd provided SICM imaging software for DSP card. Nanopipettes were made from 1.00 mm outer diameter, 0.58 mm inner diameter glass microcapillaries (Intrafil) on a laser-based Brown–Flaming puller (model P-2000, Sutter Instrument Compagny). The measured nanopipette resistance was usually 80 M Ω . Experiments were performed in HEPES control bath solution for extracellular medium and for intrapipette solution. SICM images were made on HEK293 cells before and after 30-min incubations with TNP (5 mM), LPC (30 μ M), or AA (10 μ M). The membrane roughness of cells, which is an arithmetical mean deviation of the surface, was measured from the different SICM images using Gwyddion software.

Nerve-skin preparation and single fiber recordings

The isolated skin-saphenous nerve preparation and single C-fiber recording technique were used as described previously (Alloui *et al.*, 2006). The skin of the hindpaw of 8- to 14-week-old male rat was dissected with the saphenous nerve. The skin was superfused with warm (\sim 30°C) synthetic interstitial fluid (SIF), in mM : 120 NaCl, 3.48 KCl, 5 NaHCO₃, 1.67 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 0.69 MgSO₄, 9.64 Na-gluconate, 5.5 glucose, 7.6 sucrose, and 10 HEPES, pH adjusted to 7.4 with NaOH, saturated with O₂/CO₂—95%/5%. The receptive field of an identified C-fiber was searched by mechanical probing of the skin and further characterized for mechanosensitivity with calibrated von Frey filaments. This protocol implies that all C-fibers were mechano-sensitive. Conduction velocity was < 1.3 m/s. C-fibers' receptive fields were isolated with a thick-walled elrin ring inside which solutions were applied (internal volume of 400 μ l) through local perfusion pipes of a CL-100 bipolar temperature controller (Warner instrument). Recordings were band-pass filtered between 60 Hz and 2 kHz and sampled at 10 kHz on computer with pClamp 9 software (Axon Instrument). Action potential were analyzed with Spike2 software (Cambridge Electronic Design). Spikes were discriminated off-line and visualized individually.

Pain behavior experiments in rodents

Experiments were performed on adult male Wistar rats (Charles River) and on adult male C57Black6J wild-type mice (Charles River) and ASIC3 knockout mice (Wulfsch *et al.*, 2008). The protocol was approved by the local ethical committee and the French government (agreement # 02233.01) and was in agreement with the guidelines of the Committee for Research and Ethical Issues of the International Association for the Study of Pain (Zimmermann, 1983). Animals were kept with a 12-h light/dark cycle with *ad libitum* access to food and water and were acclimated to housing and husbandry conditions for at least 1 week before experiments. For nociceptive behavior experiments, rats or mice were placed in a transparent observation chamber where they were acclimated for at

least 15 min. They were then gently restrained while saline solution (0.9% NaCl, 20 μ l for rat and 10 μ l for mouse) containing either vehicle (0.24% or 0.96% ethanol for rat and mouse, respectively), lipids (LPC and AA, 2.4 or 4.8 nmole each for rats and mice, respectively), lipids + APETx2 (0.2 nmole), or lipids + amiloride (20 nmole) was administered subcutaneously into the dorsal face of the hindpaw using a 26-gauge needle connected to a 100-ml Hamilton syringe. The amount of lipids injected into the rat hindpaws corresponds to the amount applied to a cell during a 30-s superfusion of 10 μ M LPC or AA in patch-clamp experiments. Nociceptive behaviors (i.e., number of flinches of the injected paw for rats or time spent licking, biting, or shaking their injected paw for mice) were counted over a 20-min period starting immediately after the injection.

Chemicals

APETx2 was synthesized by Synprosis/Provepep (France), and amiloride was purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). Lipids were purchased from Sigma and/or Avanti (Coker, France). All lipids were prepared as stock solutions in either saline, DMSO, or EtOH, stored at -20°C , and diluted to the final concentration into saline solutions just before the experiments. LPA was obtained from chicken egg; LPE and LPS were obtained from porcine brain; LPC and LPI were obtained from bovine brain and liver, respectively.

Human inflammatory exudates

Human samples of inflammatory exudates were collected from patients with painful acute knee-joint effusions requiring joint aspiration for diagnosis or treatment. All patients were recruited from the Rheumatology Department of Nice University Hospital (CHU-Nice, France) and provided informed consent before inclusion. The study was approved by the Nice University Institutional Review Board for Research on Human Subjects and has been conducted in accordance with the French national regulations regarding patient consent and ethical review. The study was registered in the ClinicalTrials.gov protocol registration system (NCT 01867840), and it includes patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, osteoarthritis, ankylosing spondylitis, and chondrocalcinosis. After biological analysis for patients care, the remaining exudates were aliquoted, stored at -80°C , and further used for *in vitro* electrophysiological experiments on human ASIC3 channels. For experiments in which lipids were chelated, 1 ml aliquots of exudates were supplemented with BSA powder (2 μ M final, 99% free fatty acids, Sigma), vortexed, and centrifugated 10 min at 18,000 g and 4°C .

Lipid extraction

Lipid extraction has been adapted from the Folch method (Folch *et al.*, 1957). Fifty microliters of exudates was diluted in 950 μ l of water and transferred into glass tubes with PTFE caps (Pyrex Labware) containing 500 μ l of glass beads (\varnothing 0.3–0.4 mm, Sigma-Aldrich). Mixtures were supplemented with 4 ml of 2/1 (v/v) chloroform (CHCl₃)/methanol (CH₃OH) solution and lipid standard (LPC17:0 or LPC13:0), and lipid extractions were carried out on an orbital shaker (IKA[®] VX[®] basic Vibrax[®], Sigma-Aldrich) at

1,500 rpm for 2 h at room temperature. From the resulting emulsions, aqueous phases were dissociated from the lipid-containing organic phases with a swing-out centrifuge for 5 min at 410 g. Aqueous phases were discarded, and organic ones were supplemented with 1 ml of 4/1 (v/v) 2N KCl/CH₃OH solution. Samples were shaken for 10 min, and organic and aqueous phases were separated as described before. The resulting organic phases were complemented with 1 ml of 3/48/47 (v/v/v) CHCl₃/CH₃OH/H₂O solution, and an additional shaking step was carried out. As previously described, the resulting organic phases were isolated and, then, transferred into new glass tubes. Those mixtures were supplemented with 1 ml of 3/48/47 (v/v/v) CHCl₃/CH₃OH/H₂O solution and shaken for 10 min. The final organic phases containing the whole lipids were isolated and solvent was evaporated at 80°C under a nitrogen beam (1 bar) before storage at −80°C.

Phospholipids purification and mass spectrometry analysis

Dry samples of total lipids were resuspended in 1 ml dichloromethane, by shaking for 30 s on a vortex. These solutions were loaded onto silica columns (BOND ELUT-SI, 100 mg 1 ml, Agilent Technologies) previously conditioned (cleared with 3 ml methanol and 2 ml dichloromethane successively). The bounded fractions were cleaned with 2 ml dichloromethane (for non-polar lipids elution) and 3 ml acetone (for glycolipids elution) successively. Finally, 2 ml of 50/45/5 (v/v/v) CHCl₃/CH₃OH/H₂O solution was loaded onto the columns and the eluted fractions containing the phospholipids were collected into glass tubes. Solvent was evaporated at 80°C under a nitrogen beam (1 bar), and samples were stored at −80°C prior to analysis. Dry purified phospholipids were resuspended in 100 µl of 2/1/1 (v/v/v) isopropanol/acetonitrile/water + 1% (v/v) formic acid, and the molecular species were analyzed by electrospray ionization–mass spectrometry (ESI–MS), in positive ion mode. Resulting spectrograms were notably used to analyze the acyl content of different phospholipid species by MS–MS.

Fatty acids transmethylation and gas chromatography analysis

Dry samples of total lipids were resuspended in 200 µl of cyclohexane, by shaking for 30 s on a vortex. Samples were supplemented with 2.5 ml of 2% (v/v) sulfuric acid (H₂SO₄)/CH₃OH, and trans-methylations of fatty acids (free or esterified in species such as triglycerides, sterylesters, phospholipids or lysophospholipids) were carried out at 80°C for 1.5 h (volumes were regularly adjusted with 2% (v/v) H₂SO₄/CH₃OH). Mixtures were supplemented with 1.5 ml of water and 1.5 ml of cyclohexane, shaken for 30 s, and then centrifuged at 410 g for 30 s. The resulting cyclohexane phases containing the methylesters of fatty acids were collected into separated new glass tubes. An additional extraction step was carried out with 1.5 ml of cyclohexane as previously described, and the resulting cyclohexane phases were pooled with the formers. Solvent was evaporated at 80°C under a nitrogen beam (0.5 bar), and samples were stored at −80°C prior to analysis. Dry methylesters of fatty acids were resuspended in 100 µl of cyclohexane, and 2 µl of cyclohexane was injected for gas chromatography (GC) analysis on a DB5 column (Agilent Technologies, France). Program of column elution was as follows: 50°C held for 2 min,

temperature increased by 30°C/min until 230°C and held for 12 min, and finally, temperature increased by 30°C/min until 300°C and held for 15 min. Retention time's areas under peaks of lipid standards were used to identify and quantify lipids from exudates.

Statistical analysis

Data analysis was performed using Microcal Origin 8.5 and GraphPad Prism 4.03 softwares. Data are presented as mean ± s.e.m. and statistical differences between sets of data were assessed using either parametric or nonparametric tests followed by *post hoc* tests, when appropriate.

Expanded View for this article is available online.

Acknowledgements

We thank G. Lambeau, G. Drin, B. Antonny, H. Barelli, D. Debayle, A. Baron, S. Diochot, M. Salinas, M. Chafai, and T. Besson for helpful discussions, M. Lazdunski for his support, and C. Chevance for secretarial assistance. The authors thank the imaging platform "ImageUP" (Université de Poitiers) for providing the SICM technical tools and F.J. Richard (Université de Poitiers) for providing GC technical tools. We thank the Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20110421309) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-BSV4-0009) for financial support.

Author contributions

SM, AD, and ED did electrophysiological and behavioral experiments and analyzed the data. VB, CR, and LE-Z performed the clinical aspects of the study. MC and JN did the nerve-skin experiments and analyzed the data. VF provided technical support. SS and CC did the SICM experiments and analyzed the data. RF-C and TF did the lipid extractions and further analyses. ED and EL wrote the manuscript with input from all authors and supervised the project.

Conflict of interest

The authors declared that they have no conflict of interest.

References

- Allen NJ, Attwell D (2002) Modulation of ASIC channels in rat cerebellar Purkinje neurons by ischaemia-related signals. *J Physiol* 543(Pt 2): 521–529
- Alloui A, Zimmermann K, Mamet J, Duprat F, Noel J, Chemin J, Guy N, Blondeau N, Voilley N, Rubat-Coudert C, Borsotto M, Romey G, Heurteaux C, Reeh P, Eschalier A, Lazdunski M (2006) TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J* 25: 2368–2376
- Andersson DA, Nash M, Bevan S (2007) Modulation of the cold-activated channel TRPM8 by lysophospholipids and polyunsaturated fatty acids. *J Neurosci* 27: 3347–3355
- Askwith CC, Cheng C, Ikuma M, Benson C, Price MP, Welsh MJ (2000) Neuropeptide FF and FMRFamide potentiate acid-evoked currents from sensory neurons and proton-gated DEG/ENAC channels. *Neuron* 26: 133–141
- Birdsong WT, Fierro L, Williams FG, Spelta V, Naves LA, Knowles M, Marsh-Haffner J, Adelman JP, Almers W, Elde RP, McCleskey EW (2010) Sensing muscle ischemia: coincident detection of acid and ATP via interplay of two ion channels. *Neuron* 68: 739–749
- Bohlen CJ, Chesler AT, Sharif-Naeini R, Medzihradsky KF, Zhou S, King D, Sanchez EE, Burlingame AL, Basbaum AI, Julius D (2011) A heteromeric

- Texas coral snake toxin targets acid-sensing ion channels to produce pain. *Nature* 479: 410–414
- Brohawn SG, Su Z, MacKinnon R (2014) Mechanosensitivity is mediated directly by the lipid membrane in TRAAK and TREK1 K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 3614–3619
- Cadiou H, Studer M, Jones NG, Smith ES, Ballard A, McMahon SB, McNaughton PA (2007) Modulation of acid-sensing ion channel activity by nitric oxide. *J Neurosci* 27: 13251–13260
- Chemin J, Patel A, Duprat F, Zanzouri M, Lazdunski M, Honore E (2005) Lysophosphatidic acid-operated K⁺ channels. *J Biol Chem* 280: 4415–4421
- Chen CC, Zimmer A, Sun WH, Hall J, Brownstein MJ (2002) A role for ASIC3 in the modulation of high-intensity pain stimuli. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8992–8997
- Daleau P (1999) Lysophosphatidylcholine, a metabolite which accumulates early in myocardium during ischemia, reduces gap junctional coupling in cardiac cells. *J Mol Cell Cardiol* 31: 1391–1401
- Delaunay A, Gasull X, Salinas M, Noel J, Friend V, Lingueglia E, Deval E (2012) Human ASIC3 channel dynamically adapts its activity to sense the extracellular pH in both acidic and alkaline directions. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 13124–13129
- Deval E, Baron A, Lingueglia E, Mazarguil H, Zajac JM, Lazdunski M (2003) Effects of neuropeptide SF and related peptides on acid sensing ion channel 3 and sensory neuron excitability. *Neuropharmacology* 44: 662–671
- Deval E, Noel J, Lay N, Alloui A, Diochot S, Friend V, Jodar M, Lazdunski M, Lingueglia E (2008) ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain. *EMBO J* 27: 3047–3055
- Deval E, Gasull X, Noel J, Salinas M, Baron A, Diochot S, Lingueglia E (2010) Acid-sensing ion channels (ASICs): pharmacology and implication in pain. *Pharmacol Ther* 128: 549–558
- Deval E, Noel J, Gasull X, Delaunay A, Alloui A, Friend V, Eschaliere A, Lazdunski M, Lingueglia E (2011) Acid-sensing ion channels in postoperative pain. *J Neurosci* 31: 6059–6066
- Diochot S, Baron A, Rash LD, Deval E, Escoubas P, Scarzello S, Salinas M, Lazdunski M (2004) A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *EMBO J* 23: 1516–1525
- Diochot S, Baron A, Salinas M, Douguet D, Scarzello S, Dabert-Gay AS, Debayle D, Friend V, Alloui A, Lazdunski M, Lingueglia E (2012) Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain. *Nature* 490: 552–555
- Diochot S, Alloui A, Rodrigues P, Dauvois M, Friend V, Aissouni Y, Eschaliere A, Lingueglia E, Baron A (2015) Analgesic effects of mambalgain peptide inhibitors of acid-sensing ion channels in inflammatory and neuropathic pain. *Pain* doi:10.1097/j.pain.0000000000000397
- Drew LJ, Rohrer DK, Price MP, Blaver KE, Cockayne DA, Cesare P, Wood JN (2004) Acid-sensing ion channels ASIC2 and ASIC3 do not contribute to mechanically activated currents in mammalian sensory neurones. *J Physiol* 556(Pt 3): 691–710
- Ettaiche M, Deval E, Cougnon M, Lazdunski M, Voilley N (2006) Silencing acid-sensing ion channel 1a alters cone-mediated retinal function. *J Neurosci* 26: 5800–5809
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497–509
- Fromy B, Lingueglia E, Sigaud-Roussel D, Saumet JL, Lazdunski M (2012) Asic3 is a neuronal mechanosensor for pressure-induced vasodilation that protects against pressure ulcers. *Nat Med* 18: 1205–1207
- Fuchs B, Schiller J, Wagner U, Hantzsche H, Arnold K (2005) The phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine ratio in human plasma is an indicator of the severity of rheumatoid arthritis: investigations by ³¹P NMR and MALDI-TOF MS. *Clin Biochem* 38: 925–933
- Ikeuchi M, Kolker SJ, Burnes LA, Walder RY, Sluka KA (2008) Role of ASIC3 in the primary and secondary hyperalgesia produced by joint inflammation in mice. *Pain* 137: 662–669
- Immke DC, McCleskey EW (2001) Lactate enhances the acid-sensing Na⁺ channel on ischemia-sensing neurons. *Nat Neurosci* 4: 869–870
- Inoue M, Xie W, Matsushita Y, Chun J, Aoki J, Ueda H (2008) Lysophosphatidylcholine induces neuropathic pain through an action of autotaxin to generate lysophosphatidic acid. *Neuroscience* 152: 296–298
- Izumi M, Ikeuchi M, Ji Q, Tani T (2012) Local ASIC3 modulates pain and disease progression in a rat model of osteoarthritis. *J Biomed Sci* 19: 77
- Karczewski J, Spencer RH, Garsky VM, Liang A, Leitl MD, Cato MJ, Cook SP, Kane S, Urban MO (2010) Reversal of acid-induced and inflammatory pain by the selective ASIC3 inhibitor, APETx2. *Br J Pharmacol* 161: 950–960
- Korchev YE, Bashford CL, Milovanovic M, Vodyanov I, Lab MJ (1997) Scanning ion conductance microscopy of living cells. *Biophys J* 73: 653–658
- Li WG, Yu Y, Zhang ZD, Cao H, Xu TL (2010) ASIC3 channels integrate agmatine and multiple inflammatory signals through the nonproton ligand sensing domain. *Mol Pain* 6: 88
- Li WG, Yu Y, Huang C, Cao H, Xu TL (2011) Nonproton ligand sensing domain is required for paradoxical stimulation of acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) channels by amiloride. *J Biol Chem* 286: 42635–42646
- Lundbaek JA, Andersen OS (1994) Lysophospholipids modulate channel function by altering the mechanical properties of lipid bilayers. *J Gen Physiol* 104: 645–673
- Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M, Honore E (2000) Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K⁽⁺⁾ channels TREK-1 and TRAAK. *J Biol Chem* 275: 10128–10133
- Mazucca M, Heurteaux C, Alloui A, Diochot S, Baron A, Voilley N, Blondeau N, Escoubas P, Gelot A, Cupo A, Zimmer A, Zimmer AM, Eschaliere A, Lazdunski M (2007) A tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms. *Nat Neurosci* 10: 943–945
- Meyer zu Heringdorf D, Jakobs KH (2007) Lysophospholipid receptors: signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1768: 923–940
- Molliver DC, Immke DC, Fierro L, Pare M, Rice FL, McCleskey EW (2005) ASIC3, an acid-sensing ion channel, is expressed in metaboreceptive sensory neurons. *Mol Pain* 1: 35
- Murakami M, Taketomi Y, Miki Y, Sato H, Hirabayashi T, Yamamoto K (2011) Recent progress in phospholipase A(2) research: from cells to animals to humans. *Prog Lipid Res* 50: 152–192
- Noël J, Salinas M, Baron A, Diochot S, Deval E, Lingueglia E (2010) Current perspectives on acid-sensing ion channels: new advances and therapeutic implications. *Expert Rev Clin Pharmacol* 3: 331–346.
- Novak P, Li C, Shevchuk AI, Stepanyan R, Caldwell M, Hughes S, Smart TG, Gorelik J, Ostanin VP, Lab MJ, Moss GW, Frolenkov GI, Klennerman D, Korchev YE (2009) Nanoscale live-cell imaging using hopping probe ion conductance microscopy. *Nat Methods* 6: 279–281
- Page AJ, Brierley SM, Martin CM, Price MP, Symonds E, Butler R, Wemmie JA, Blackshaw LA (2005) Different contributions of ASIC channels 1a, 2, and 3 in gastrointestinal mechanosensory function. *Gut* 54: 1408–1415
- Pascher I, Lundmark M, Nyholm PG, Sundell S (1992) Crystal structures of membrane lipids. *Biochim Biophys Acta* 1113: 339–373
- Price MP, McIlwrath SL, Xie J, Cheng C, Qiao J, Tarr DE, Sluka KA, Brennan TJ, Lewin GR, Welsh MJ (2001) The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. *Neuron* 32: 1071–1083

- Scholz A, Appel N, Vogel W (1998) Two types of TTX-resistant and one TTX-sensitive Na⁺ channel in rat dorsal root ganglion neurons and their blockade by halothane. *Eur J Neurosci* 10: 2547–2556
- Scroggs RS, Fox AP (1992) Calcium current variation between acutely isolated adult rat dorsal root ganglion neurons of different size. *J Physiol* 445: 639–658
- Sedlis SP, Hom M, Sequeira JM, Esposito R (1993) Lysophosphatidylcholine accumulation in ischemic human myocardium. *J Lab Clin Med* 121: 111–117
- Sheetz MP, Singer SJ (1974) Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 4457–4461
- Sheetz MP, Painter RG, Singer SJ (1976) Biological membranes as bilayer couples. III. Compensatory shape changes induced in membranes. *J Cell Biol* 70: 193–203
- Smith ES, Cadiou H, McNaughton PA (2007) Arachidonic acid potentiates acid-sensing ion channels in rat sensory neurons by a direct action. *Neuroscience* 145: 686–698
- Sugimura N, Ikeuchi M, Izumi M, Kawano T, Aso K, Kato T, Ushida T, Yokoyama M, Tani T (2015) Repeated intra-articular injections of acidic saline produce long-lasting joint pain and widespread hyperalgesia. *Eur J Pain* 19: 629–638
- Sutherland SP, Benson CJ, Adelman JP, McCleskey EW (2001) Acid-sensing ion channel 3 matches the acid-gated current in cardiac ischemia-sensing neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 711–716
- Svennerholm L (1968) Distribution and fatty acid composition of phosphoglycerides in normal human brain. *J Lipid Res* 9: 570–579
- Walder RY, Gautam M, Wilson SP, Benson CJ, Sluka KA (2011) Selective targeting of ASIC3 using artificial miRNAs inhibits primary and secondary hyperalgesia after muscle inflammation. *Pain* 152: 2348–2356
- Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Heurteaux C, Lazdunski M (1997) A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* 386: 173–177
- Wallace VC, Cottrell DF, Brophy PJ, Fleetwood-Walker SM (2003) Focal lysolecithin-induced demyelination of peripheral afferents results in neuropathic pain behavior that is attenuated by cannabinoids. *J Neurosci* 23: 3221–3233
- Wang X, Li WG, Yu Y, Xiao X, Cheng J, Zeng WZ, Peng Z, Xi Zhu M, Xu TL (2013) Serotonin facilitates peripheral pain sensitivity in a manner that depends on the nonproton ligand sensing domain of ASIC3 channel. *J Neurosci* 33: 4265–4279
- Wemmie JA, Taugher RJ, Kreple CJ (2013) Acid-sensing ion channels in pain and disease. *Nat Rev Neurosci* 14: 461–471
- Wiesner P, Leidl K, Boettcher A, Schmitz G, Liebisch G (2009) Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Lipid Res* 50: 574–585
- Wultsch T, Painsipp E, Shahbazian A, Mitrovic M, Edelsbrunner M, Lazdunski M, Waldmann R, Holzer P (2008) Deletion of the acid-sensing ion channel ASIC3 prevents gastritis-induced acid hyperresponsiveness of the stomach-brainstem axis. *Pain* 134: 245–253
- Yu Y, Chen Z, Li WG, Cao H, Feng EG, Yu F, Liu H, Jiang H, Xu TL (2010) A nonproton ligand sensor in the acid-sensing ion channel. *Neuron* 68: 61–72
- Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16: 109–110

En complément des résultats publiés dans cet article, nous avons développés deux modèles de douleurs chroniques qui nous ont permis d'obtenir des résultats préliminaires.

Le premier modèle, est un modèle de douleur musculaire chronique. C'est une adaptation du modèle développé par le groupe de Kathleen Sluka. Il consiste en deux injections séparées d'un intervalle de cinq jours, d'une solution acide dans le muscle gastrocnémien chez la souris. Cette double injection induit une hyperalgie mécanique secondaire (*i.e.*, au niveau de la patte) qui perdure dans le temps (*i.e.*, jusqu'à 4 semaines) et qui est dépendante des canaux ASIC3 (Sluka et al., 2011 ; Sluka et al., 2003). Nous avons adapté ce modèle en injectant non pas une solution acide, mais du sérum physiologique contenant de l'AA et de la LPC (4.8 nmole de chaque) ou de l'éthanol 0.96% (véhicule, souris contrôles).

Les résultats préliminaires montrent que les souris injectées avec le cocktail de lipides développent une hyperalgie mécanique après la deuxième injection. Cette hyperalgie dure jusqu'à deux semaines après la deuxième injection [**Figure 28**]. Cela équivaut à la durée de l'hyperalgie induite par l'injection d'une solution à pH 5.0, décrite dans la littérature (Sluka et al., 2001).

Ces expériences doivent maintenant être menées chez les souris KO ASIC3 pour démontrer l'implication des canaux ASIC3 dans cette hyperalgie mécanique secondaire.

Seuil de retrait de la patte
normalisé

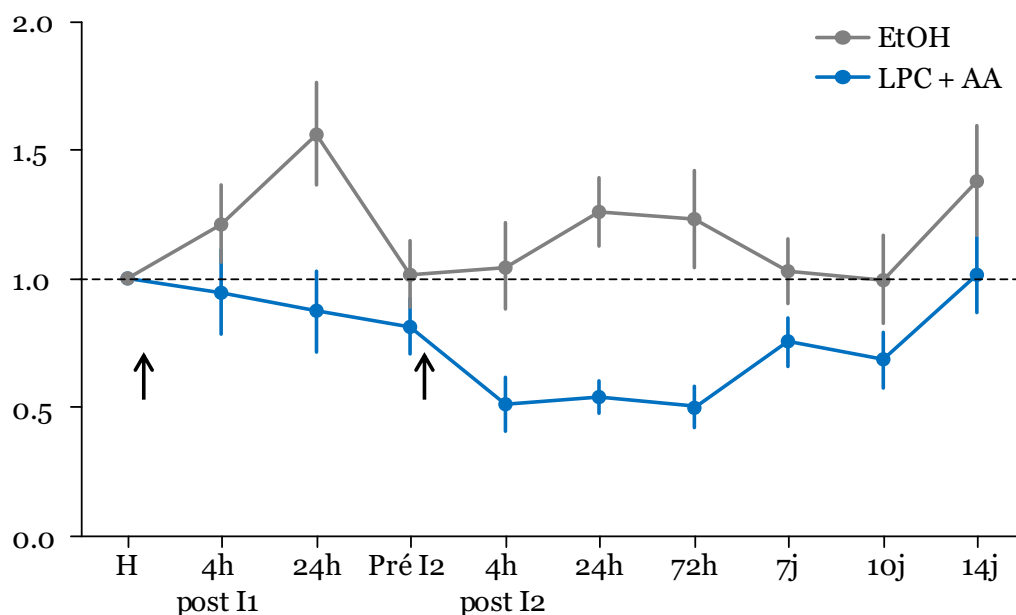


Figure 28 : Hyperalgie mécanique musculaire secondaire.

Les lipides (LPC + AA, 4.8 nmole de chaque) ou le véhicule (éthanol 0.96%) sont injectés dans le muscle gastrocnémien de la patte droite de la souris. Les deux flèches noires représentent les deux injections. Le comportement douloureux est observé en mesurant le seuil mécanique de retrait de la patte (en grammes) en utilisant un appareil (Von Frey dynamique) permettant d'appliquer une pression croissante sous la patte de l'animal. Les résultats sont normalisés par rapport au seuil basal avant la première injection. Les résultats préliminaires montrent qu'après la deuxième injection une hyperalgie mécanique secondaire se développe chez les souris injectées avec les lipides. Cette hyperalgie ne se développe pas chez les souris injectées avec de l'éthanol (n = 12).

Le deuxième modèle, est un modèle de douleur articulaire chronique. C'est une adaptation du modèle développé par le groupe de Masahiko Ikeuchi (Sugimura et al., 2015). Le protocole est le même que celui du modèle de douleur musculaire chronique, à deux différences près. Cette fois les deux injections ont lieu chez la souris, dans l'articulation du genou et non pas dans le muscle et nous n'injections que de la LPC (9.6 nmole) ou de l'éthanol 0.96% (véhicule, souris contrôles).

Les résultats obtenus montrent que les souris injectées avec la LPC développent une hyperalgie mécanique secondaire après la deuxième injection. Cette hyperalgie dure au moins 4 semaines après la deuxième injection [**Figure 29**]. Cela équivaut à la durée de l'hyperalgie induite par l'injection d'une solution à pH 4.0 chez le rat, décrite dans la littérature (Sugimura et al., 2015).

En lien avec nos résultats publiés, ce modèle semble plus relevant que celui de douleur musculaire, car nos lipides sont issus d'exsudats provenant d'inflammations articulaires. Ce modèle pourrait donc être un bon modèle des pathologies rhumatismales douloureuses.

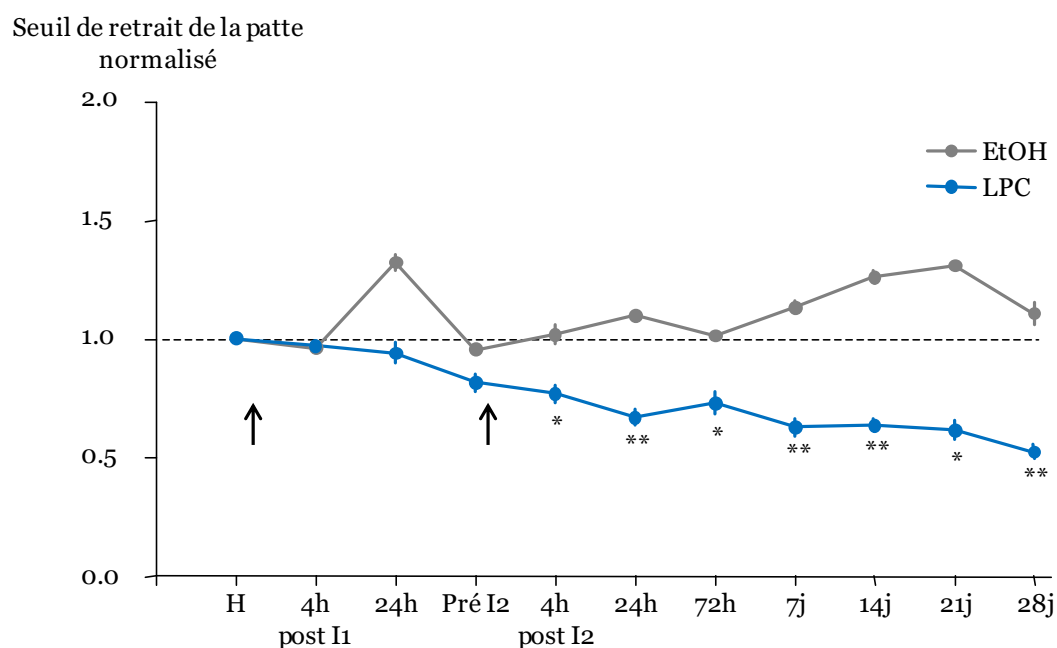


Figure 29 : Hyperalgie mécanique articulaire secondaire.

La LPC (9.6 nmole) ou le véhicule (éthanol 0.96%) sont injectés dans l'articulation du genou de la patte gauche de la souris. Les deux flèches noires représentent les deux injections. Le comportement douloureux est observé en mesurant le seuil mécanique de retrait de la patte (en grammes) en utilisant un appareil (Von Frey dynamique) permettant d'appliquer une pression croissante sous la patte de l'animal. Les résultats sont normalisés par rapport au seuil basal avant la première injection. Les résultats montrent qu'après la deuxième injection, une hyperalgie mécanique secondaire significative se développe chez les souris injectées avec la LPC (n=13). Cette hyperalgie ne se développe pas chez les souris injectées avec de l'éthanol (n = 11). (* $P < 0.05$ et ** $P < 0.01$, test de Wilcoxon).

B- THERMORÉGULATION DES CANAUX ASIC

1. Préface de l'étude

Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire par électrophysiologie et lors de tests comportementaux suggèrent un rôle des canaux ASIC3 dans la thermosensibilité au froid.

Premièrement, un refroidissement de 29 à 19°C entraîne un fort ralentissement de l'inactivation des canaux ASIC3 (Q_{10} de 7.4) [**Figure 30A**]. Le Q_{10} est un coefficient qui mesure le taux de modification d'un paramètre pour une variation de température de 10°C. Par convention, on considère qu'un Q_{10} supérieur à 3 démontre une forte sensibilité à la température.

Deuxièmement, lors d'un test d'immersion de la queue dans un bain à 10°C, dans lequel on mesure le temps de latence de retrait de la queue, les souris KO ASIC3 ($16.878 \pm 1.208s$) présentent un temps de latence supérieur à celui des souris sauvages ($12.163 \pm 0.494s$). Les souris KO ASIC3 ont donc une perception thermique du froid nocif qui semble être altérée [**Figure 30B**]. Lors de la seconde partie de ma thèse, j'ai donc approfondi l'étude des effets de la température sur les canaux ASIC

Cette étude, qui fera l'objet d'une publication future, résulte d'une collaboration entre notre équipe et l'équipe du Pr. Alain Eschalier à Clermont-Ferrand. L'ensemble des résultats électrophysiologiques présentés ci-après ont été obtenus par moi-même, alors que les tests comportementaux ont été réalisés par nos collaborateurs clermontois.

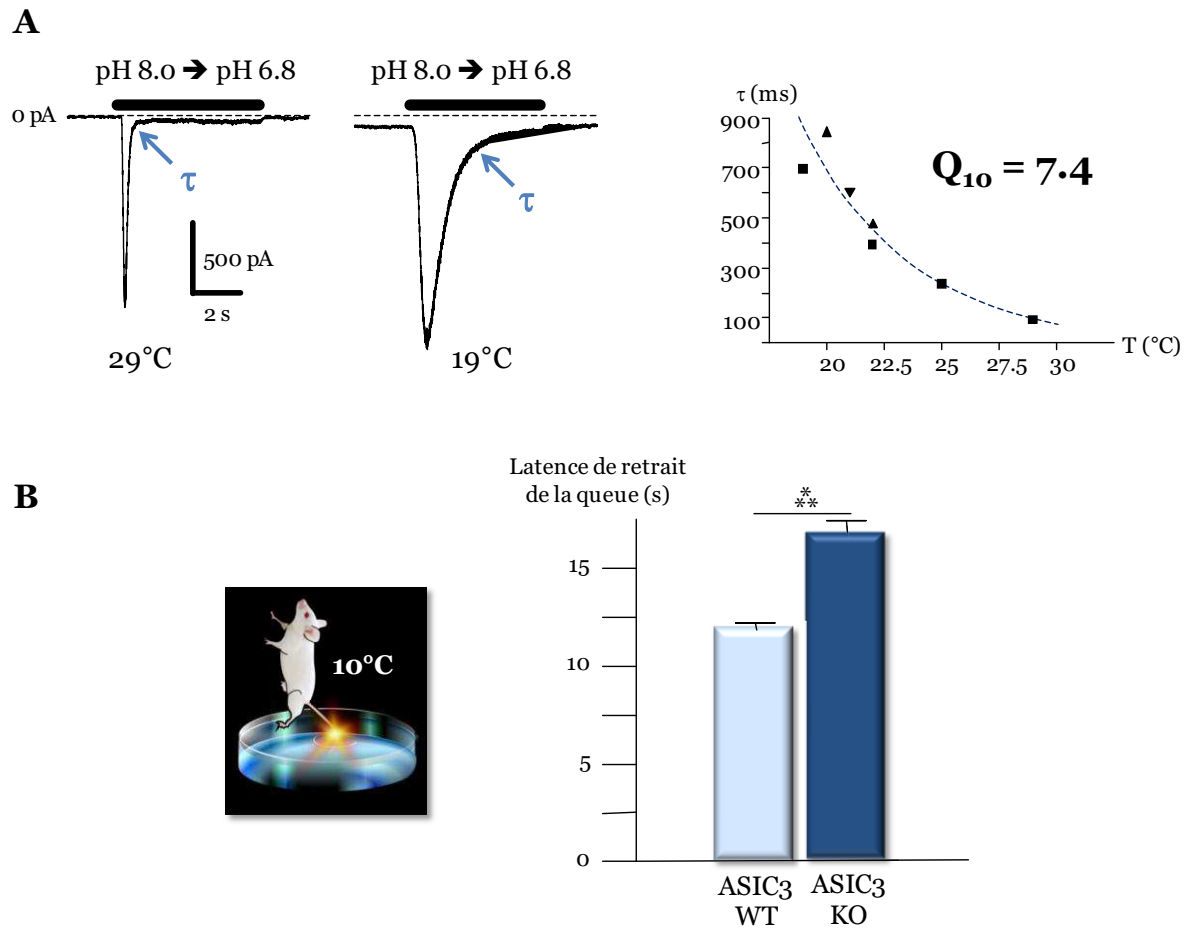


Figure 30 : Sensibilité thermique des canaux ASIC3.

A. Effet du refroidissement de 29 à 19°C sur la vitesse d'inactivation des canaux ASIC3 transfectés dans des cellules HEK293. Mesure du Q_{10} du τ d'inactivation à différentes températures.

B. Test de l'immersion de la queue. A 10°C, les souris KO ASIC3 un temps de latence plus important que les souris sauvages (WT) (*** $P < 0.001$, Mann-Whitney U-test, $n = 9$).

2. Résultats de l'étude

Dans les expériences de patch-clamp, la température de conditionnement est toujours de 30°C. J'ai d'abord testé la dépendance thermique au froid de l'inactivation de tous les canaux ASIC.

Lors d'un refroidissement de 30 à 20°C, les Q_{10} des τ d'inactivation des canaux ASIC1a ($Q_{10} : 5.64 \pm 0.44$, $n=9$), ASIC1b ($Q_{10} : 4.6 \pm 0.47$, $n=8$), ASIC2a ($Q_{10} : 4.78 \pm 0.44$, $n=8$), ASIC3 rat ($Q_{10} : 5.42 \pm 0.22$, $n=10$) et humain ($Q_{10} : 4.92 \pm 0.6$, $n=8$) sont tous supérieurs à 3 [**Figure 31**]. Le Q_{10} que j'ai pu mesurer pour ASIC3 est différent de celui présenté dans la figure précédente (7.4 vs 5.42).

Dans l'expérience précédente [**Figure 30A**], le pH n'avait pas été mesuré à chaque température et le système utilisé ne permettait pas un refroidissement rapide. Alors que pour cette expérience [**Figure 31**], j'ai mesuré le pH des solutions à 30 et à 20°C et j'ai utilisé un nouveau système permettant un refroidissement rapide.

L'inactivation de tous les canaux ASIC est donc fortement sensible au refroidissement. Ce ralentissement de l'inactivation a pour conséquence une augmentation de la quantité totale de courant entrant, ce qui pourrait aboutir à une augmentation de l'excitabilité neuronale.

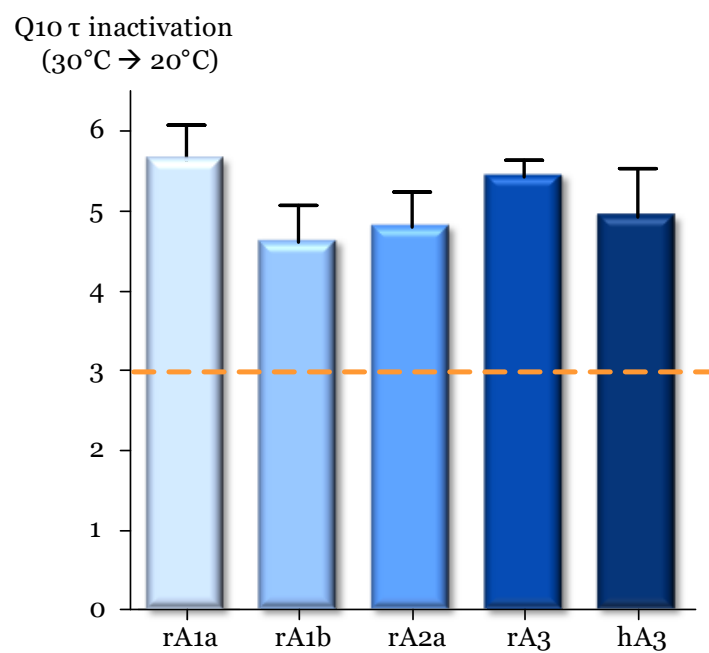


Figure 31 : Sensibilité thermique de l'inactivation des canaux ASIC.

Mesure du Q_{10} des constantes de temps d'inactivation (τ) des canaux ASIC entre 30 et 20°C. Tous les canaux ASIC ont un Q_{10} supérieur à 3, signe d'une forte sensibilité thermique de l'inactivation.

Etant donné la forte sensibilité au froid de tous les canaux ASIC, je me suis ensuite intéressé aux possibles effets activateurs du froid sur ces canaux.

Pour cela j'ai utilisé un refroidissement thermoélectrique grâce à un élément Peltier. En présence d'un courant électrique, cet élément permet un déplacement de chaleur entre deux éléments conducteurs. L'un des deux éléments se réchauffe tandis que l'autre se refroidit. Son application pour le patch-clamp a été développée en 2006. Il permet de refroidir ou de réchauffer rapidement une solution perfusée à proximité d'une cellule durant un enregistrement électrophysiologique (Dittert et al., 2006).

Le protocole de stimulation [**Figure 32**] consiste à une première stimulation à pH 6.6 à 30°C pour vérifier la présence des canaux ASIC dans la cellule transfectée. Puis, grâce à l'élément Peltier, on peut perfuser à proximité de la cellule une solution à 15°C. Le refroidissement est quasi instantané, il permet de passer en moins d'une seconde d'une solution à pH 7.4 à 30°C à une solution à pH 7.4 à 15°C. Les pH des solutions sont mesurés aux bonnes températures et ce protocole permet de conserver un flux constant.

Ainsi les courants observés sont bien dus au froid lui-même et non pas à des effets mécaniques ou à des effets d'acidification/d'alcalinisation de la solution générés par son changement de température.

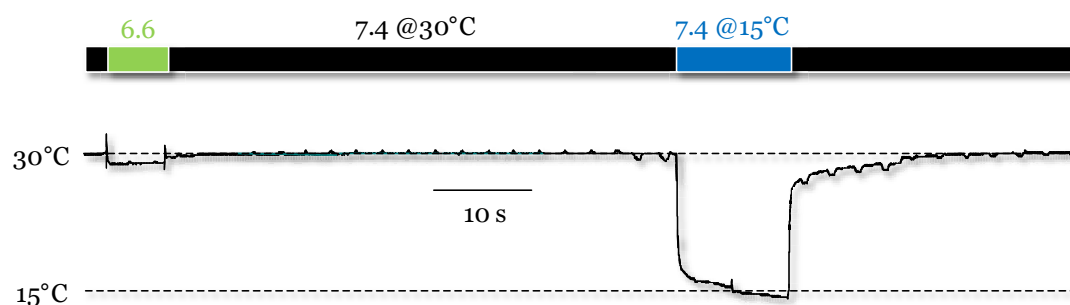


Figure 32 : Protocole de refroidissement par patch-clamp.

Protocole de stimulation thermique froide grâce à l'élément Peltier. Une première stimulation de pH 6.6 à 30°C est appliquée, puis un temps de lavage qui dure 30 à 60 secondes, suivi d'une stimulation froide de pH 7.4 à 15°C.

En système hétérologue, une stimulation à 15°C est capable d'activer directement les canaux ASIC3 sans acidification du milieu extracellulaire. Le froid engendre un courant entrant soutenu, qui perdure tant qu'est maintenu le refroidissement. Il active aussi bien les isoformes de rats et humaines d'ASIC3 [**Figures 33A et 33B**].

A contrario, une stimulation à 15°C n'a aucun effet sur les cellules non transfectées [**Figure 33D**], ni sur les cellules transfectées avec les canaux ASIC1a [**Figure 33C**], ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b et ASIC4 (résultats non présentés).

L'ensemble des densités de courants ASIC induits par un refroidissement sont regroupés dans le **graphique 33E**.

En l'absence d'acidification, une stimulation froide à 15°C active spécifiquement les canaux ASIC3. Les canaux ASIC3 pourraient donc être des détecteurs du froid.

J'ai également testé les effets de deux activateurs des canaux TRPM8 et TRPA1 sensibles au froid (*i.e.*, le menthol et « l'icilin »). Ces deux composés ne sont pas capables d'activer à pH physiologique les canaux ASIC3 (résultats non présentés).

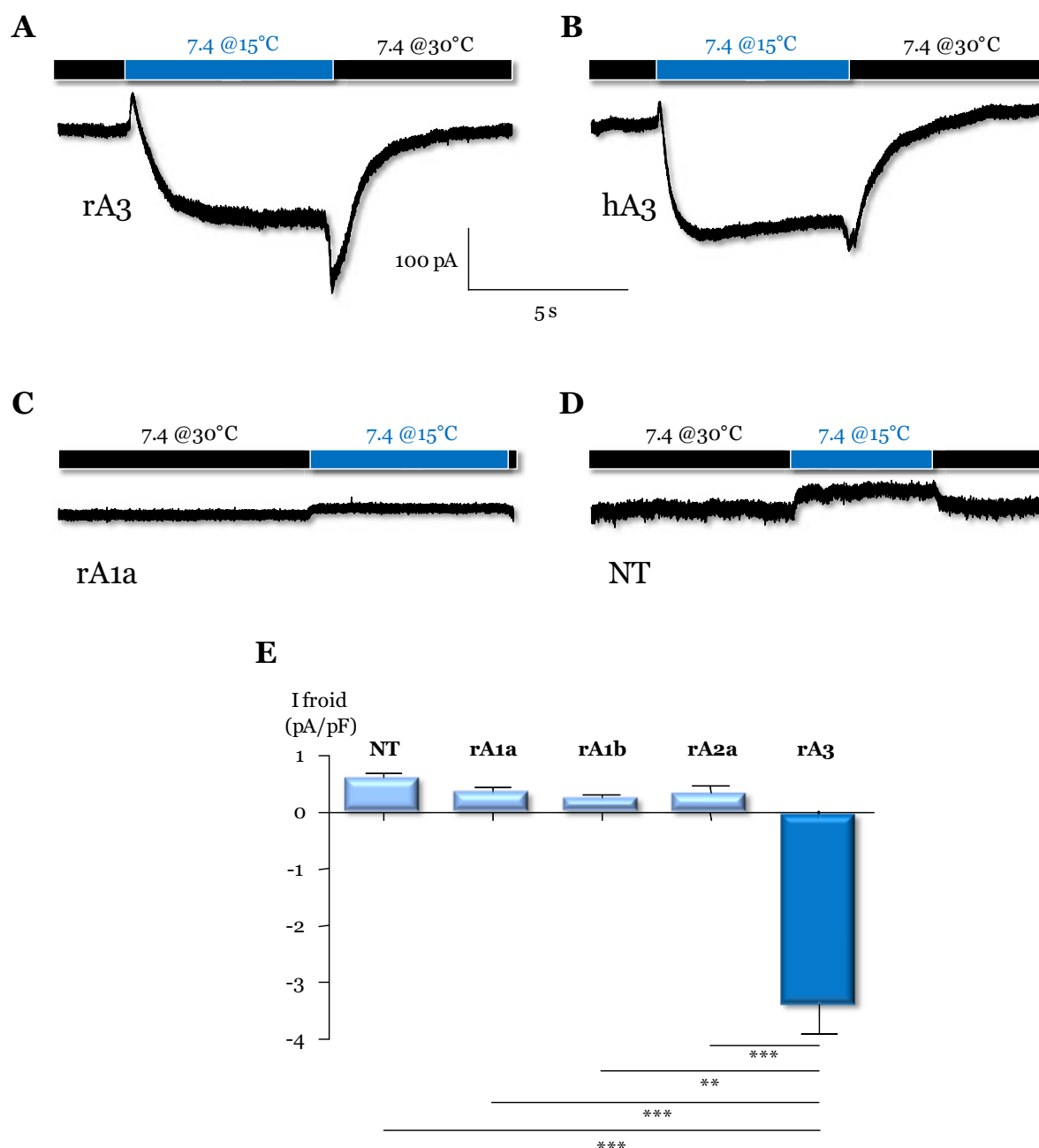


Figure 33 : Activation par le froid des canaux ASIC3 à pH physiologique.

Enregistrements en configuration cellule entière dans des cellules HEK293.

A. Le froid à 15°C induit un courant entrant soutenu et réversible dans les cellules transfectées avec les canaux ASIC3 de rats.

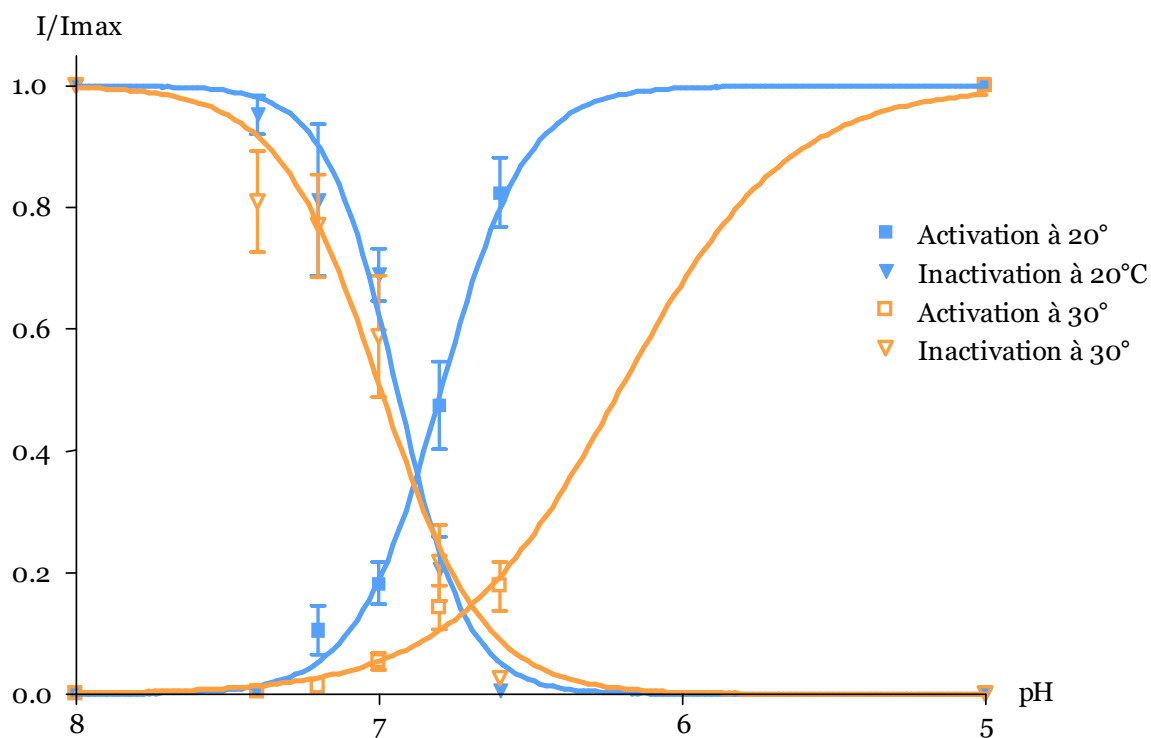
B. Courant entrant soutenu et réversible dans les cellules transfectées avec les canaux ASIC3 humains.

C. D. Le froid n'induit pas de courant entrant observable dans les cellules transfectées avec les canaux ASIC1a de rats (C), ni dans les cellules non transfectées.

E. Amplitude moyenne (\pm SEM) des densités de courant des différents ASIC à 15°C à pH 7.4 (** $P < 0.01$ et *** $P < 0.001$, Mann-Whitney U-test, n = 9-14).

Le froid agit sur les canaux ASIC en déplaçant la courbe d'activation dépendante du pH vers des valeurs plus alcalines, sans effet sur la courbe d'inactivation [**Figure 34**]. Il y a donc une modification du pH de demi-activation, mais pas du pH de demi-inactivation des canaux ASIC3 [**Tableau de la figure 34**].

Ce décalage a pour conséquence une augmentation du courant de fenêtre similairement à ce qui se produit en présence d'AA et de la LPC. Comme avec ces lipides, le décalage de la courbe d'activation engendré par un refroidissement est suffisant pour observer un courant constitutif à pH 7.4 à 15°C.



Température	pH demi-activation	pH demi-inactivation
@ 20°C	6.795	6.94
@ 30°C	6.20	6.995

Figure 34 : Activation et inactivation d'ASIC3.

Effet de la température sur la dépendance au pH des courbes d'activation et d'inactivation des canaux ASIC3 à 30°C (orange) et à 20°C (bleu). Les courants ASIC3 induits par une stimulation acide sont normalisés par rapport à l'amplitude maximale du pic de courant à pH 5.0. Le tableau présente des $pH_{0.5}$ d'activation et d'inactivation des courants ASIC3 à 30 et à 20°C.

Des résultats préliminaires obtenus sur des neurones DRG de rats, montrent que dans la majorité des neurones ASIC positifs (*i.e.*, qui présentent un courant de type ASIC en réponse à une stimulation acide à pH 6.6), l'application d'une solution à pH 7.4 à 15°C induit un courant entrant soutenu (n=3/4) [**Figure 35**]. Ce courant ne semble pas être présent dans les neurones ASIC négatifs (n=0/3).

Ces observations doivent être complétées en présence de différents inhibiteurs des canaux ASIC, ainsi qu'en présence d'inhibiteurs des canaux senseurs du froid : TRPM8 et TRPA1.

De plus il serait intéressant de tester ces effets sur des neurones DRG de souris sauvages et de souris KO ASIC3.

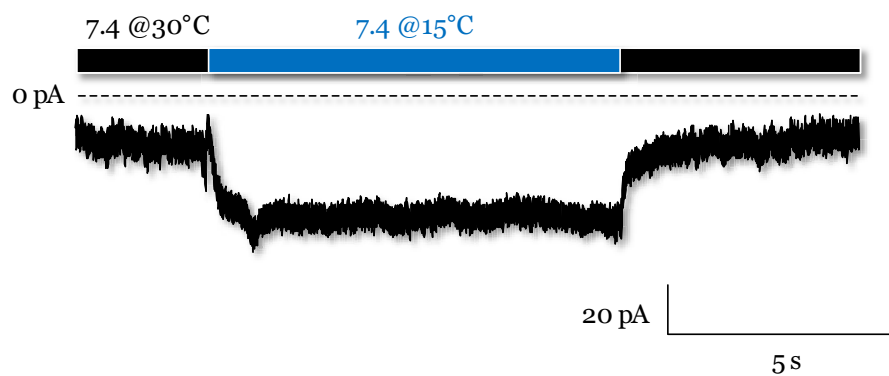


Figure 35 : Activation d'un courant froid dans les neurones DRG.

Enregistrements en configuration cellule entière dans des neurones DRG. Une stimulation à 15°C active un courant entrant soutenu et réversible dans les neurones présentant un courant de type ASIC induit par une diminution du pH ($n = 4$).

Les résultats que j'ai pu obtenir par patch-clamp semblent indiquer que les canaux ASIC3 recombinants et natifs sont activés directement par un refroidissement extracellulaire de 30 à 15°C, sans acidification.

Les canaux ASIC3 pourraient donc être des détecteurs du froid et plus particulièrement du froid nocif.

Les résultats présentés dans la suite de ce manuscrit sont préliminaires et sont issus de tests comportementaux réalisés par le Dr Abdelkrim Alloui et le Dr Ludivine Boudieu à Clermont-Ferrand (UMR1107 INSERM/Université Clermont Auvergne).

Le premier test comportemental est le test de la préférence de place.

Ce test est préférentiellement utilisé pour mesurer une perception sensorielle plutôt qu'une perception douloureuse. La souris est placée sur deux plaques métalliques juxtaposées dont on peut faire varier la température. La première plaque reste toujours à 25°C, alors que la température de la deuxième est fixée à une température différente. Pour chaque expérience, on mesure le temps passé par la souris sur la plaque à 25°C. Naturellement, plus la température de la deuxième plaque est froide, plus la souris passe de temps à 25°C.

Les souris KO ASIC1a discriminent moins bien une température de 20°C que les souris sauvages. A cette température, elles passent en moyenne 63% ($63.12\% \pm 3.07$) de leur temps à 25°C, contre 78% du temps ($78.36\% \pm 3.59$) pour les souris sauvages [**Figure 36A**].

Les souris KO ASIC3 sont incapables de discriminer une diminution de la température entre 25 et 23°C et entre 25 et 20°C. Lorsque la deuxième plaque est à 23°C ou 20°C, les souris KO ASIC3 passent respectivement 37% ($37.35\% \pm 4.71$) et 45% ($45.05\% \pm 8.09$) de leur temps à 25° contre 62% ($61.82\% \pm 5.41$) et 81% ($80.71\% \pm 5.29$) pour les souris sauvages [**Figure 36B**].

Lors d'un refroidissement de la température dans une gamme non nocive, les souris KO ASIC3 sont donc incapables de faire la différence entre les deux températures. *In vivo*, les canaux ASIC3 semblent donc être importants pour la perception du froid non nocif.

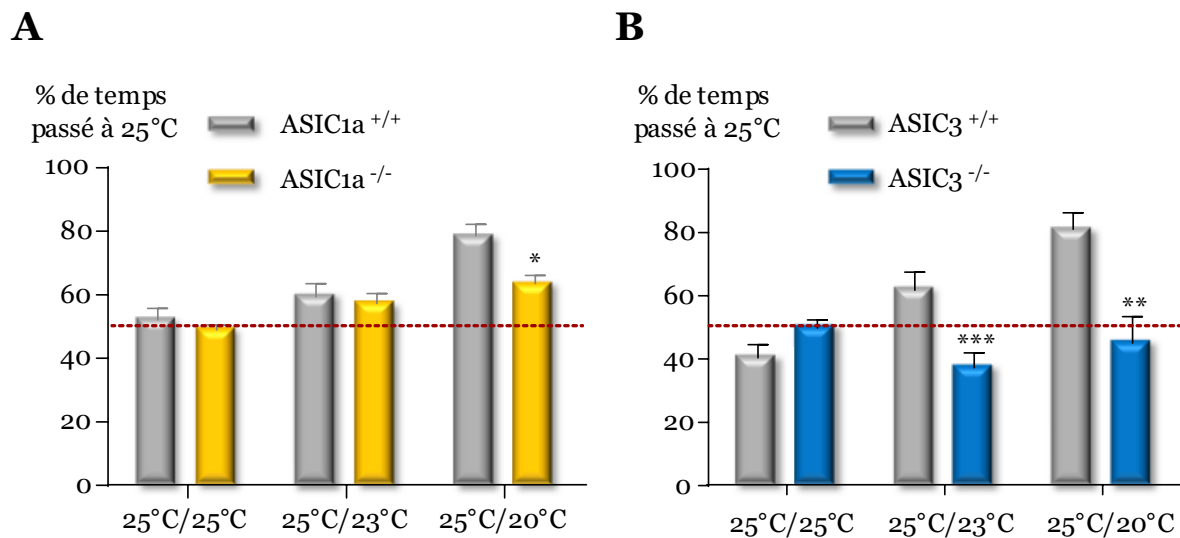


Figure 36 : Test de la préférence de place : ASIC et froid sensoriel.

Test de la préférence de place durant 3 minutes.

A. Pourcentage de temps passé par les souris sauvages et KO ASIC1a sur la plaque à la température de contrôle (25°C) versus le temps passé sur la plaque à la température test (25°C/23°C/20°C) durant 3 minutes. Les souris KO ASIC1a discriminent moins bien que les souris sauvages une température de 20°C (* $P < 0.05$, Mann-Whitney U-test, $n = 9$).

B. Pourcentage de temps passé par les souris sauvages et KO ASIC3 sur la plaque à la température de contrôle (25°C) versus le temps passé sur la plaque à la température test (25°C/23°C/20°C) durant 3 minutes. Les souris KO ASIC3 discriminent moins bien que les souris sauvages des températures de 23 et 20°C (** $P < 0.01$ et *** $P < 0.001$, Mann-Whitney U-test, $n = 11$).

Le test comportemental suivant est le test de rampe de température froide.

La souris est placée sur une plaque métallique dont la température initiale est à 30°C. La température de la plaque va refroidir de 1°C par minute jusqu'à atteindre une valeur nulle. Ce test permet donc de mesurer à la fois les perceptions sensorielle et douloureuse. Le comportement est ici mesuré en comptant le nombre de saut par minute (*i.e.*, par degré).

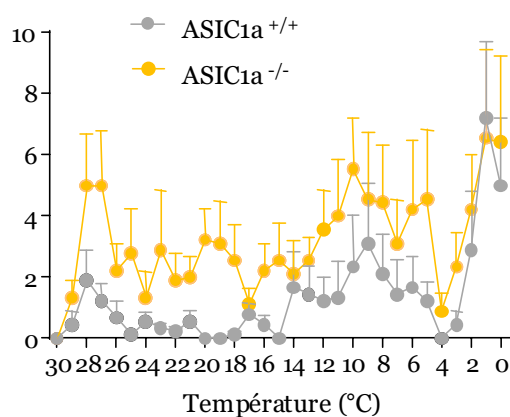
Les souris KO ASIC1a et sauvages ne présentent aucune différence significative de perception thermique sur toute la durée de la rampe [**Figure 37A**]. Toutefois ces expériences doivent être poursuivies, car les souris sauvages présentent un comportement inhabituel (nombre de sauts assez faible).

A contrario, les souris KO ASIC3 présentent une insensibilité thermique quasi-totale sur toute la rampe, laissant apparaître une différence significative pour des températures froides nocives inférieures à 14°C [**Figure 37B**].

D'après ces premiers résultats qui demandent eux aussi confirmation, les souris ASIC3 semblent être moins sensibles au froid, notamment au froid nocif.

A

Nombre de sauts

**B**

Nombre de sauts

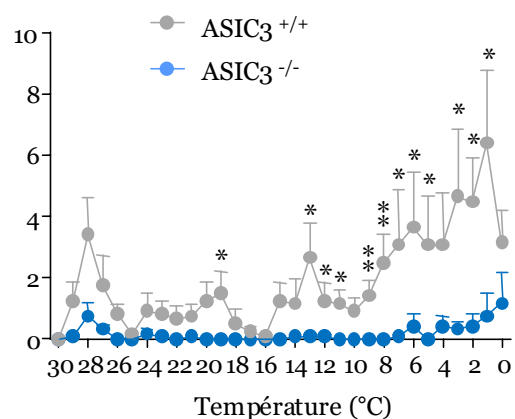


Figure 37 : Test de la rampe froide : ASIC et froids sensoriels et nocifs.

A. Nombre de sauts des souris sauvages et KO ASIC1a sur une plaque refroidissante de 1°C par minute de 30 à 0°C. Pas de différence significative entre les souris KO ASIC1a et les souris sauvages (n = 9).

B. Nombre de sauts des souris sauvages et KO ASIC3 sur une plaque refroidissante de 1°C par minute de 30 à 0°C. Les souris KO ASIC3 ne sont pas sensibles au froid nocif en dessous de 13°C (* $P < 0.05$ et ** $P < 0.01$, Mann-Whitney U-test, n = 12).

Le dernier test consiste à plonger la queue d'une souris dans un bain à une température donnée. On mesure ensuite le temps de latence de retrait de la queue de l'animal.

Comme dans le test précédent, les souris KO ASIC1a et les souris sauvages présentent un comportement similaire. Que ce soit à 20°C ou à 10°C on n'observe aucune différence significative dans le temps de latence de retrait de la queue [**Figure 38A**]. A 20°C les souris KO ASIC3 ($24s \pm 0.852$) et les souris sauvages ($20.79s \pm 1.82$) se comportent de la même manière, alors qu'à 10°C le temps de latence de retrait de la queue des souris KO ASIC3 ($19.48s \pm 1.28$) est bien supérieur à celui des souris sauvages ($7.929s \pm 0.767$) [**Figure 38B**].

Les souris ASIC3 sont donc moins à même de percevoir le froid nocif à 10°C.

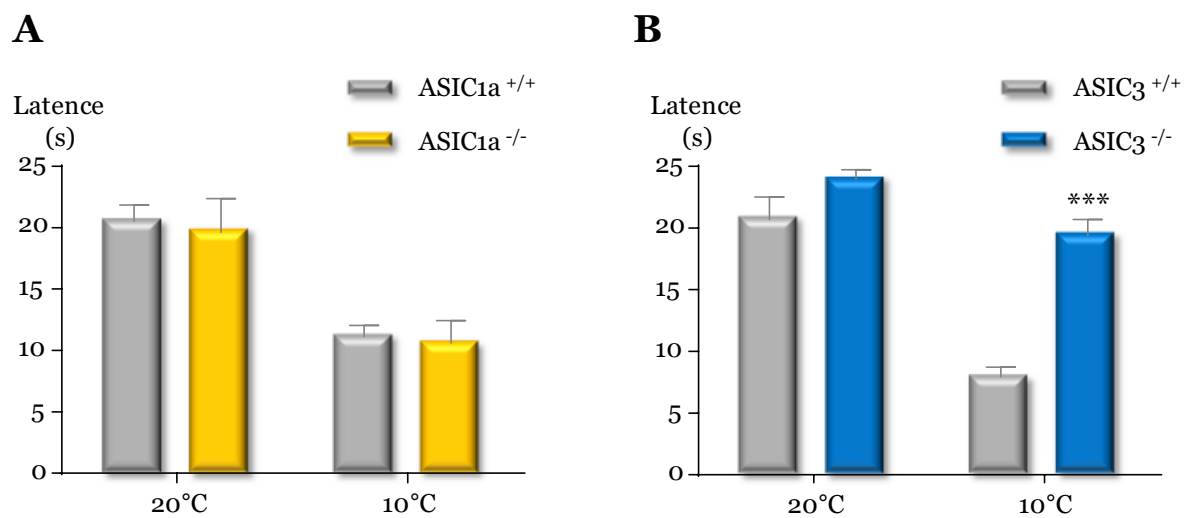


Figure 38 : Test d'immersion de la queue : ASIC et froid nocif.

A. Temps de latence de retrait de la queue à 20°C et à 10°C. Comparaison entre les souris sauvages et KO ASIC1a. Pas de différence entre les souris KO ASIC1a et les souris sauvages (n = 8).

B. Temps de latence de retrait de la queue à 20°C et à 10°C. Comparaison entre les souris sauvages et KO ASIC3. A 10°C, les souris KO ASIC3 ont une perception du froid altérée (***) $P < 0.001$, Mann-Whitney U-test, n = 7-14).

3. Conclusion de l'étude

Bien que cette étude ne soit pas complète, les premiers résultats obtenus suggèrent que les canaux ASIC3 sont activés par le froid sans acidification extracellulaire. Si on corrobore ces résultats aux données obtenues lors des tests comportementaux, les canaux ASIC3 seraient de nouveaux canaux impliqués dans la détection du froid. Ces canaux pourraient être, au même titre que les canaux TRPM8 et TRPA1, des senseurs du froid.

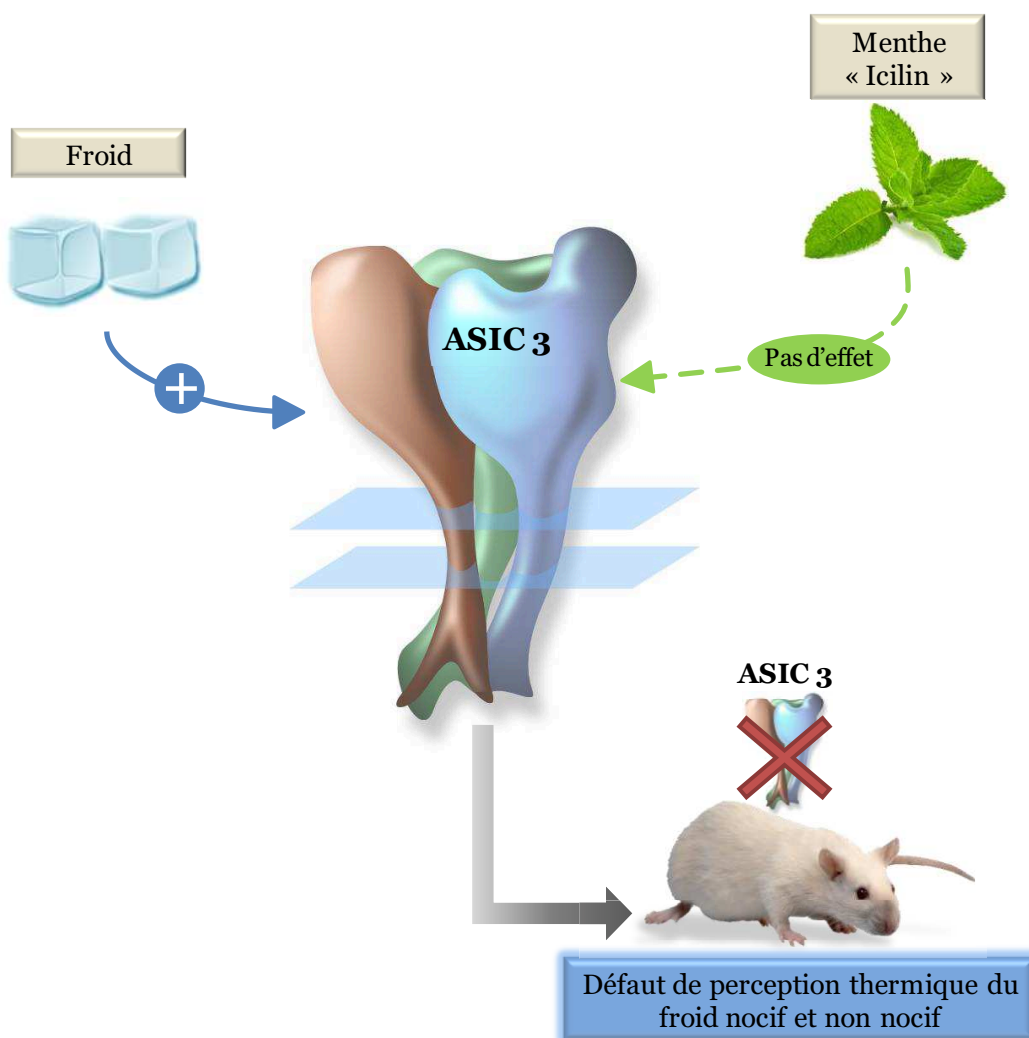


Figure 39 : Conclusion - activation d'ASIC3 par le froid.

DISCUSSION

La douleur, première cause de consultation en médecine générale, et son traitement sont des enjeux majeurs pour notre société (Tajfel et al., 2002). Il est primordial de mieux comprendre les mécanismes physiologiques et physiopathologiques à l'origine du processus douloureux, notamment au niveau moléculaire, afin d'identifier de nouvelles cibles dans le but d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques et à terme parvenir à une meilleure prise en charge des patients.

Une acidose tissulaire est retrouvée dans de nombreuses conditions physiopathologiques douloureuses telles qu'une ischémie (Pan et al., 1999), le développement de certaines tumeurs (Garber, 2003) ou encore une inflammation (Punna-Moorthy, 1987). Les canaux ASIC, notamment les canaux ASIC1a et ASIC3, sont des canaux ioniques qui sont capables de s'activer en réponse à une faible acidification. Ces canaux constituent donc des cibles thérapeutiques d'intérêts en vue de soulager la douleur qui accompagne de nombreuses conditions pathologiques.

Durant ma thèse je me suis intéressé à la régulation des canaux ASIC et plus particulièrement des canaux ASIC3. J'ai pu démontrer l'existence de deux nouveaux activateurs endogènes des canaux ASIC, ainsi qu'une implication de ces canaux dans la thermoperception du froid.

A- NOUVEL ACTIVATEUR ENDOGÈNE D'ASIC3

Bien que jusqu'à présent, le seul activateur endogène connu des canaux ASIC soit le proton, l'activité de ces canaux et plus particulièrement d'ASIC3 peut être modulée par de nombreux composants de la soupe inflammatoire tels que le lactate (Immke et McCleskey, 2001a, 2001b), la sérotonine (Deval et al., 2004 ; Wang et al., 2013), l'hypertonie (Deval et al., 2008) ou encore l'ATP (Birdsong et al., 2010). Ces composés peuvent agir de manière synergique (Deval et al., 2008 ; Li et al., 2010), renforçant ainsi l'idée que les canaux ASIC3 joueraient un rôle majeur dans la détection des différents stimuli inflammatoires.

Outre l'activation par les protons, il a été montré que le GMQ, un composé synthétique, était capable d'activer les canaux ASIC3 à pH physiologique (*i.e.*, pH 7.4) via un site de fixation différent de celui des protons (Yu et al., 2010). La découverte de ce site « non-proton dépendant » conjugué aux travaux sur la modulation des canaux ASIC3 par des médiateurs inflammatoires ouvrent la porte à la découverte de nouveaux activateurs endogènes des canaux ASIC3.

Mes travaux de thèse démontrent que des exsudats inflammatoires articulaires humains provenant de patients atteints de différentes pathologies rhumatismales (*i.e.*, polyarthrite rhumatoïde, spondylarthrite ankylosante et ostéo-arthrite) sont capables d'activer les canaux ASIC3 à pH physiologique. Cette activation sans acidification extracellulaire, ce qui ne signifie pas pour autant indépendante des protons, est portée en grande partie par des lipides présents dans ces exsudats inflammatoires. Nous avons ainsi pu identifier deux lipides inflammatoires, la LPC et l'AA comme nouveaux activateurs endogènes des canaux ASIC3. Une étude menée au laboratoire avait déjà démontré que l'AA avait un effet potentialisateur ainsi qu'un possible effet activateur des courants ASIC3 (Deval et al., 2008). Contrairement à l'AA, les effets de la LPC n'avaient encore jamais été étudiés.

Les effets de la LPC et de l'AA sont additifs. D'un point de vue physiologique cette observation est pertinente car l'hydrolyse des phosphatidylcholines membranaires (*i.e.*, le principal phospholipide membranaire) (Svennerholm, 1968 ; Van Meer et al., 2008) par les sPLA2, notamment la sPLA2-X, conduit majoritairement et simultanément à la production de ces deux lipides (Murakami et al., 2011).

Lors d'une expérience préliminaire, j'ai testé par patch-clamp les effets de l'application de sPLA2, durant quelques minutes, sur des cellules transfectées avec les canaux ASIC3, sans grand succès. L'hydrolyse des phospholipides membranaires nécessite sans doute un laps de temps trop important pour qu'on puisse observer un effet à si court terme. Pour poursuivre ces travaux il serait intéressant de voir si la composition lipidique membranaire module l'activité des canaux ASIC3. Pour cela il est envisageable d'enrichir, de manière durable, les membranes cellulaires avec des lipides soigneusement choisis et de mesurer ensuite l'activité des canaux ioniques par patch-clamp.

Par contre, il pourrait être intéressant de tester les effets d'une injection de sPLA2 *in vivo*. Il faudrait alors (i) observer si cette injection induit un comportement douloureux chez les souris sauvages, et (ii) si tel est le cas, répéter la même expérience chez des souris KO ASIC3.

D'un point de vue mécanistique, la LPC et l'AA agissent d'une manière similaire au GMQ en décalant la courbe d'activation des canaux ASIC3 vers des pH plus alcalins. Ce décalage conduit à une augmentation du courant de fenêtre et donc à une activation à pH physiologique (Alijevic et Kellenberger, 2012). Des données préliminaires obtenues récemment au laboratoire suggèrent que la LPC et l'AA seraient sans doute capables de décaler légèrement les courbes d'activation des autres canaux ASIC sans toutefois les décaler suffisamment pour engendrer une activation à pH 7.4. La LPC et l'AA seraient dans ce cas des potentialisateurs de l'activité des canaux ASIC1 et ASIC2.

Dans le but de se rapprocher de la composition des canaux natifs, il serait intéressant de tester l'effet de ces lipides en système hétérologue sur les différents canaux ASIC hétéromériques (ASIC3+1a, ASIC3+1b, ASIC3+2a). Ces combinaisons représentent vraisemblablement la majorité des canaux ASIC natifs dans les neurones DRG.

La principale question soulevée par mes travaux de thèse concerne le mécanisme d'action de ces deux lipides sur les canaux ASIC3. En effet, l'activation des canaux ASIC3 par la LPC est-elle due à un effet direct (*i.e.*, sur le canal) ou à un effet indirect (*i.e.*, membranaire ou via un partenaire).

Contrairement au LPA et malgré une publication qui s'est avérée être erronée (Kabarowski et al., 2001), à ce jour aucun récepteur pour la LPC n'a pu être identifié.

Bien que la LPC soit capable d'activer les canaux TREK/TRAAK et de moduler l'activité des canaux TRPM8, deux familles de canaux ioniques impliqués dans la douleur, aucune interaction directe entre la LPC et ces canaux n'a pu être démontrée. L'activation des canaux mécanosensibles de la famille des K₂P, ne serait pas due à un effet direct, mais elle serait la conséquence d'une déformation membranaire (Maingret et al., 2000b). Alors que sur les canaux TRPM8, la LPC module la sensibilité au froid, selon un mécanisme pour l'heure inconnu (Andersson et al., 2007).

Dans la littérature, la possible mécanosensibilité des canaux ASIC3 est toujours discutée. En effet, bien que ces canaux ne semblent pas être directement activés par une stimulation mécanique (Drew et al., 2004) il a été démontré qu'ils participent à la mécanoperception (Price et al., 2001 ; Page et al., 2005 ; Fromy et al., 2012 ; Jalalvand et al., 2016 ; Lin et al., 2016).

Les résultats publiés montrent qu'en configuration de patch-clamp excisé la LPC active les canaux ASIC3 du côté extracellulaire et que des modifications de la courbure membranaire (convexe et concave) n'ont au contraire aucun effet (Marra et al., 2016).

Mes résultats non publiés utilisant des canaux chimériques « ASIC1a+loop3 » (parties intracellulaires et transmembranaires d'ASIC1a + boucle extracellulaire d'ASIC3) et « ASIC3+loop1a » (parties intracellulaires et transmembranaires d'ASIC3 + boucle extracellulaire d'ASIC1a) montrent que l'intégralité du canal ASIC3 est nécessaire pour avoir un effet activateur de la LPC.

Bien que nous ne pouvons pas totalement exclure un effet mécanique et que nous n'avons pas de preuve formelle d'une interaction LPC-ASIC3, mes résultats suggèrent une interaction directe entre la LPC et les canaux ASIC3 au niveau extracellulaire (sur le canal ou à la jonction entre le canal et la membrane plasmique). Il serait intéressant, par patch-clamp, de voir si des mutations au niveau du site « non-proton dépendant » du GMQ altèrent les effets de la LPC sur les canaux ASIC3.

On pourrait également tester l'interaction entre la boucle extracellulaire et la LPC grâce à une technique de biochimie (*i.e.*, « dot-blot »). Après avoir réalisé la synthèse de la boucle extracellulaire et l'avoir découpé en différents fragments, en utilisant des lipides marqués, il est possible de déterminer s'il existe une région clé impliquée dans la fixation de la LPC sur cette boucle.

Si cette expérience ne s'avère pas concluante, il ne sera pas possible de conclure quant à une éventuelle fixation de la LPC sur la boucle extracellulaire, car dans cette expérience, cette dernière sera linéaire et n'aura pas sa conformation tridimensionnelle. A contrario, un résultat positif renforcerait fortement l'idée d'une interaction directe entre les canaux ASIC3 et la LPC.

L'activation directe d'un canal ionique par un lysophospholipide a déjà été démontrée par le passé. Cette activation des canaux TRPV1 par le LPA met en jeu une interaction lipide-protéine au niveau intracellulaire via la partie C-terminale du canal. Cette interaction entre le LPA (chargé négativement) et TRPV1 nécessite une lysine clé (chargée positivement) du domaine C-terminal du canal (Nieto-Posadas et al., 2012). Cependant, contrairement au LPA, la LPC est électriquement neutre et elle agit uniquement du côté extracellulaire. Il est donc peu probable d'envisager le même type d'interaction que celle du LPA avec TRPV1.

De par la structure de la LPC, on pourrait imaginer que la chaîne carbonée s'ancre/s'insère dans la membrane plasmique et que la tête choline vienne se fixer au niveau de la boucle extracellulaire du canal ASIC3. Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi une certaine longueur de chaîne et un certain nombre d'insaturations sont nécessaires pour avoir un effet de la LPC. En effet, une chaîne carbonée trop courte, ne permettrait pas à la tête choline d'atteindre sa région cible sur la boucle extracellulaire du canal.

D'un point de vue comportemental, contrairement au LPA qui est capable de générer une douleur chez les rongeurs (Inoue et al., 2004 ; Ueda, 2008 ; Nieto-Posadas et al., 2012), aucun lien n'a jamais été établi entre douleur et LPC.

Etant donné que la LPC est un précurseur du LPA, nous nous sommes assuré que l'effet observé était bien dû à la LPC elle-même. En effet, il a déjà été montré que la LPC pouvait générer une douleur mais uniquement lorsqu'elle était métabolisée en LPA sous l'action de l'autotaxine (Inoue et al., 2008). Le Dr Anne Delaunay (ancienne doctorante du laboratoire) et moi-même avons pu montrer que l'activation des canaux ASIC3, ainsi que le comportement douloureux généré (chez les rats) sont bien dus à la LPC et non pas au LPA, étant donné que nous avons obtenus les mêmes résultats en utilisant une LPC non métabolisable [**Figure 40**].

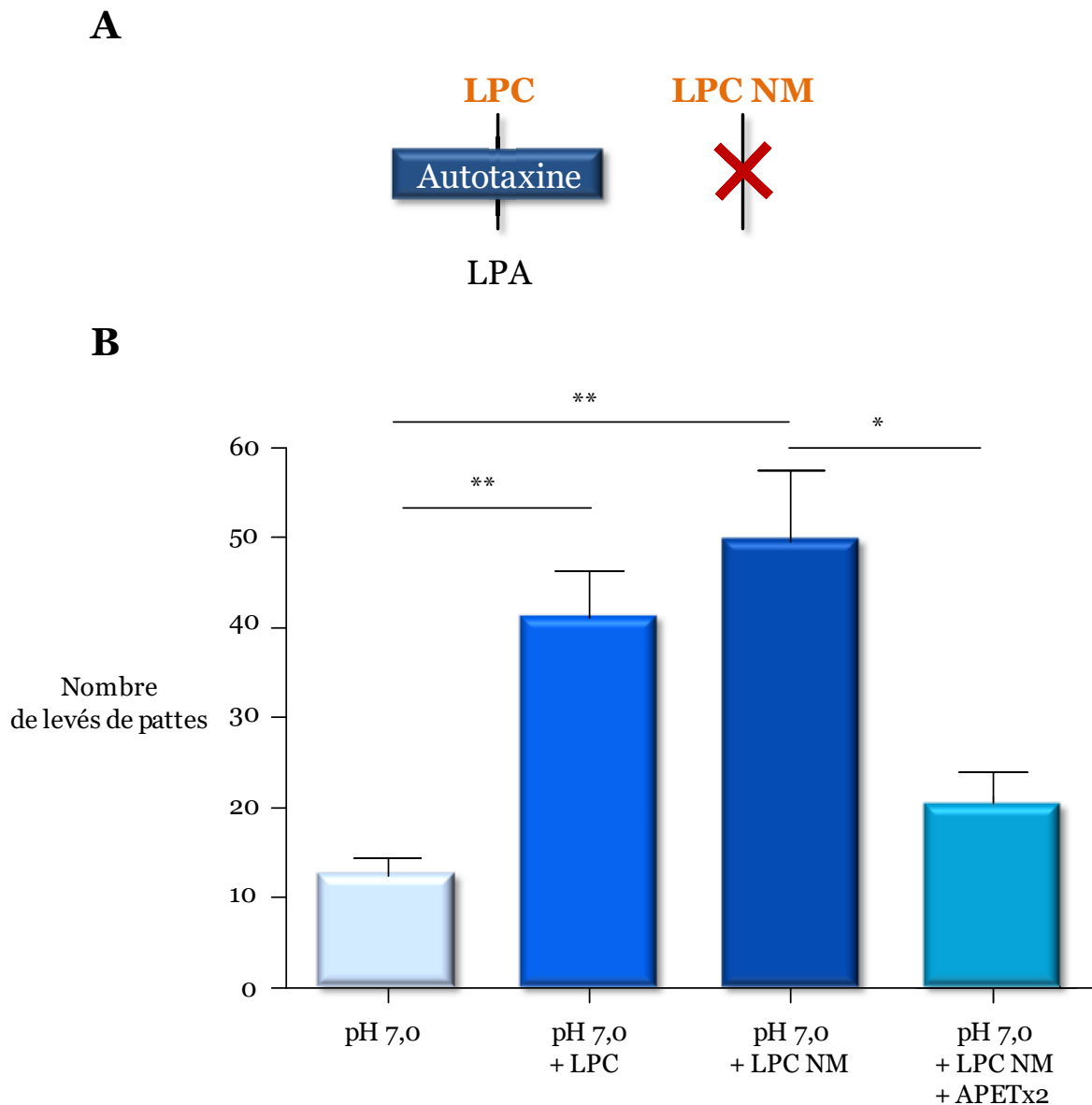


Figure 40 : Effets de la LPC et de la LPC NM sur la douleur aigüe

A. La LPC donne du LPA via l'action de l'autotaxine, alors que la LPC NM (non métabolisable) ne peut pas être métabolisée en LPA.

B. Test de « flinching » (levés de pattes).

Nombre de levés de pattes durant 20 minutes après l'injection de 20µL en sous-cutanée sur le dessus de la patte du rat. Les rats sont injectés soit avec du NaCl 0.9%, HEPES 20 mM à pH 7.0, soit avec la même solution contenant du LPC à 60µM ou du LPC NM à 60 µM ou du LPC NM + APETx2 à 10 µM (* $P < 0.05$ et ** $P < 0.01$, Mann-Whitney U-test, respectivement $n = 8$; $n = 13$; $n = 16$; $n = 5$).

Mes travaux ont donc permis de mettre en évidence la LPC et l'AA comme nouveaux activateurs endogènes des canaux ASIC3. Ainsi cette étude renforce l'idée que les canaux ASIC3 ne seraient pas uniquement des senseurs d'acidité, mais plutôt des détecteurs de coïncidences, capables de percevoir une grande variété de stimuli. De plus, nous démontrons pour la première fois un lien entre la LPC et la douleur.

D'un point de vue clinique, les canaux ASIC3 apparaissent comme des cibles thérapeutiques d'intérêts, notamment pour soulager les douleurs associées aux pathologies inflammatoires rhumatismales chez l'homme.

B- ACTIVATION D'ASIC₃ PAR LE FROID

La transduction du froid qu'il soit ou non nocif met principalement en jeu deux canaux ioniques que sont les canaux TRPM8 et TRPA1 (McKemy et al., 2002 ; Peier et al., 2002 ; Story et al., 2003). Les autres canaux impliqués dans la thermoperception froide (*i.e.*, canaux K2P et canaux Na_v1.8 et Na_v1.9) modulent la sensibilité neuronale au froid, mais ne sont pas des détecteurs du froid (Zimmermann et al., 2007 ; Noël et al., 2009 ; Pereira et al., 2014 ; Lollignier et al., 2015).

Les canaux TRPM8 et TRPA1 ne peuvent pas expliquer l'intégralité de la réponse au froid aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

Premièrement, il a été montré par imagerie calcique que plus d'un tiers des neurones sensibles au froid n'expriment ni les canaux TRPM8, ni les canaux TRPA1 (Munns et al., 2007). Deuxièmement, la perception du froid n'est pas complètement abolie chez les animaux doublement invalidés pour ces deux canaux, la souris double KO TRPM8/TRPA1 (Knowlton et al., 2010).

L'ensemble de ces résultats suggèrent donc qu'il pourrait exister d'autres canaux ioniques impliqués dans la perception et la transduction du froid, notamment du froid nocif.

La thermosensibilité des canaux ASIC n'a été que peu étudiée par le passé (Askwith et al., 2001 ; Neelands et al., 2010 ; Blanchard et Kellenberger, 2011). Une seule étude s'est intéressée aux effets du froid/du refroidissement sur les canaux ASIC.

Elle a montré que tous les canaux ASIC, mais plus particulièrement ASIC2a, sont sensibles au refroidissement. Le refroidissement induit notamment un fort ralentissement de l'inactivation des courants ASIC. Cependant, en l'absence d'une acidification extracellulaire, le froid n'est pas capable d'activer directement les canaux ASIC (Askwith et al., 2001). Néanmoins, il faut noter que ces résultats sont à relativiser car les pH des solutions n'ont pas été vérifiés à chaque température.

Durant la seconde partie de ma thèse, mes travaux ont permis de confirmer que l'inactivation de tous les canaux ASIC est modulée par la température. Mais, contrairement aux résultats déjà publiés, j'ai pu montrer que le froid (*i.e.*, 15°C) est capable d'activer spécifiquement les canaux ASIC3 sans acidification extracellulaire. De manière similaire aux lipides, le froid décale la courbe d'activation des canaux ASIC3 vers des pH plus alcalins. Ce décalage est suffisant pour entraîner l'activation d'un courant constitutif à pH physiologique. De par sa faible amplitude, le courant ASIC3 induit par le froid pourrait sembler négligeable comparé à celui induit par une acidification. Pourtant il est constitutif et dure tant que la température froide est maintenue, ce qui peut avoir des conséquences physiopathologiques.

Premièrement, un faible courant mais qui est soutenu et persistant dans le temps entraîne au final une entrée d'ions sodiques plus importante qu'un courant transitoire de forte amplitude.

Deuxièmement, l'amplitude de ce courant est similaire à celle des courants en présence de LPC et d'AA. Nous avons vu que l'activation persistante des canaux ASIC3 par ces lipides engendrent un comportement douloureux chez les animaux. Troisièmement, en système hétérologue, les amplitudes des courants ASIC3 et TRPM8 en réponse à un refroidissement similaire sont du même ordre de grandeur (Liu et al., 2006 ; Andersson et al., 2007). Il est donc tout à fait possible que l'activation des canaux ASIC3 par le froid soit suffisante pour avoir un rôle physiologique dans la perception thermique froide.

Enfin, nos résultats comportementaux corroborent les données électrophysiologiques, confirmant le rôle d'ASIC3 dans la thermoperception froide non nocive et nocive.

Néanmoins, il est pour l'heure encore difficile de conclure définitivement si les canaux ASIC3 sont des senseurs du froid, c'est-à-dire qu'ils s'activent à partir d'une température donnée, ou simplement s'ils sont sensibles à la dynamique du refroidissement, ou à un delta de température.

En effet, si ces canaux sont des senseurs du froid, on peut s'attendre à ce qu'ils aient un seuil thermique d'activation et une activité « proportionnelle » à la température appliquée. C'est par exemple le cas pour les canaux TRPM8 qui s'activent progressivement entre 27 et 23°C et saturent à 8°C (McKemy et al., 2002 ; Peier et al., 2002 ; Liu et al., 2006).

Par manque de temps, je n'ai pas réussi à déterminer le seuil d'activation des canaux ASIC3, pour lesquels une stimulation à pH 7.4 entre 18 et 14°C induit des courants d'amplitudes similaires. Il est donc nécessaire de poursuivre les investigations à des températures plus élevées pour essayer de déterminer entre 30 et 18°C, le seuil thermique d'activation des canaux ASIC3. De plus, pour des raisons techniques, je n'ai pas pu atteindre des températures inférieures à 14°C. Il m'est donc impossible, à l'heure actuelle, de conclure sur la gamme de sensibilité au froid des canaux ASIC3.

La mise en évidence du seuil d'activation pourrait nous orienter sur le rôle de ces canaux dans la thermoperception non nocive ou nocive. Les données obtenues *in vivo*, suggèrent elles un rôle à la fois dans la perception des froids non nocif et nocif. Les résultats obtenus avec les souris KO TRPM8 et KO TRPA1 montrent que seuls les canaux TRPM8 ont un rôle *in vivo*, préférentiellement dans la perception thermique non nocive. Mais ces canaux n'expliquant pas l'intégralité de la perception thermique froide (Bautista et al., 2006 ; Knowlton et al., 2010).

Les canaux ASIC3 pourraient potentiellement jouer un rôle dans la perception thermique nocive.

Outre les expériences d'électrophysiologie et de comportement, il serait intéressant de réaliser des hybridations *in situ*, afin de tester la co-localisation des canaux ASIC3 avec les autres canaux impliqués dans la thermoperception froide. Si les canaux ASIC3 co-localisent dans les mêmes neurones que d'autres canaux thermosensibles, ils pourraient agir de concert. A contrario, les canaux ASIC3 pourraient être les canaux responsables de la réponse au froid de toute ou partie des quelques 30% de neurones n'exprimant ni les canaux TRPM8, ni les canaux TRPA1 (Munns et al., 2007).

En l'état actuel des connaissances, les canaux ASIC3 pourraient être des senseurs du froid ou d'un refroidissement dynamique. Leur activation ne dépendrait alors pas forcément d'une valeur absolue de température, mais elle pourrait être dépendante, soit d'un delta de température (*i.e.*, la différence de température entre les températures de conditionnement et de stimulation), soit de la vitesse du refroidissement appliqué.

Il est possible d'envisager un lien entre lipides, températures et canaux ASIC3. Ce lien a déjà été établi par l'équipe du Pr Stuart Bevan avec les canaux TRPM8. Ces canaux connus pour être des senseurs du froid, voient leur seuil d'activation thermique s'élever de 27°C à une température proche de la température corporelle en présence de la LPC (Andersson et al., 2007 ; Gentry et al., 2010). On peut donc penser que le froid pourraient moduler les effets de la LPC sur ASIC3 et inversement.

Il serait intéressant de tester par patch-clamp la combinaison des effets de la LPC et du froid, qui pourrait aboutir à un état « figé » du canal et donc possiblement à une forte activation prolongée.

De plus, le froid et les lipides sont deux « paramètres » qui peuvent intervenir dans la mécanosensibilité. Le fait que les canaux ASIC3 soit sensibles à ces deux paramètres entretient le doute quant à la mécanosensibilité de ces canaux, qui reste matière à débats.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Mes travaux ont permis de démontrer que le proton n'est plus l'unique activateur endogène des canaux ASIC3. Ces canaux peuvent être activés à pH physiologique par des lipides inflammatoires (*i.e.*, la LPC et l'AA), ainsi que par une stimulation froide. *In vivo*, la régulation des canaux ASIC3 aussi bien par les lipides inflammatoires, que par le froid, confirme le rôle prépondérant de ces canaux dans les perceptions sensorielles et douloureuses.

D'un point de vue physiologique, il apparaît donc clairement que les canaux ASIC3 ne sont pas uniquement des senseurs de l'acidose extracellulaire, mais plutôt des détecteurs de coïncidence. Ces observations renforcent le rôle des canaux ASIC3 dans la perception douloureuse.

Les douleurs associées aux pathologies inflammatoires articulaires, telles que la polyarthrite rhumatoïde et la spondylarthrite ankylosante, sont mal soulagées par les traitements actuels, qui sont généralement des AINS. Bien que récemment, un nouveau traitement, basé sur des anticorps monoclonaux anti-TNF- α , ait été développé pour lutter contre ces douleurs persistantes, il est nécessaire de trouver de nouvelles stratégies antalgiques. Actuellement, une étude clinique est menée au CHU de Nice en collaboration avec notre équipe. Cette étude a pour but d'établir à grande échelle, une corrélation entre : pathologies, quantité de lipides et activation d'ASIC3.

Les canaux ASIC3 apparaissent de plus en plus comme des cibles thérapeutiques d'intérêts, notamment pour soulager la douleur articulaire chez l'homme.

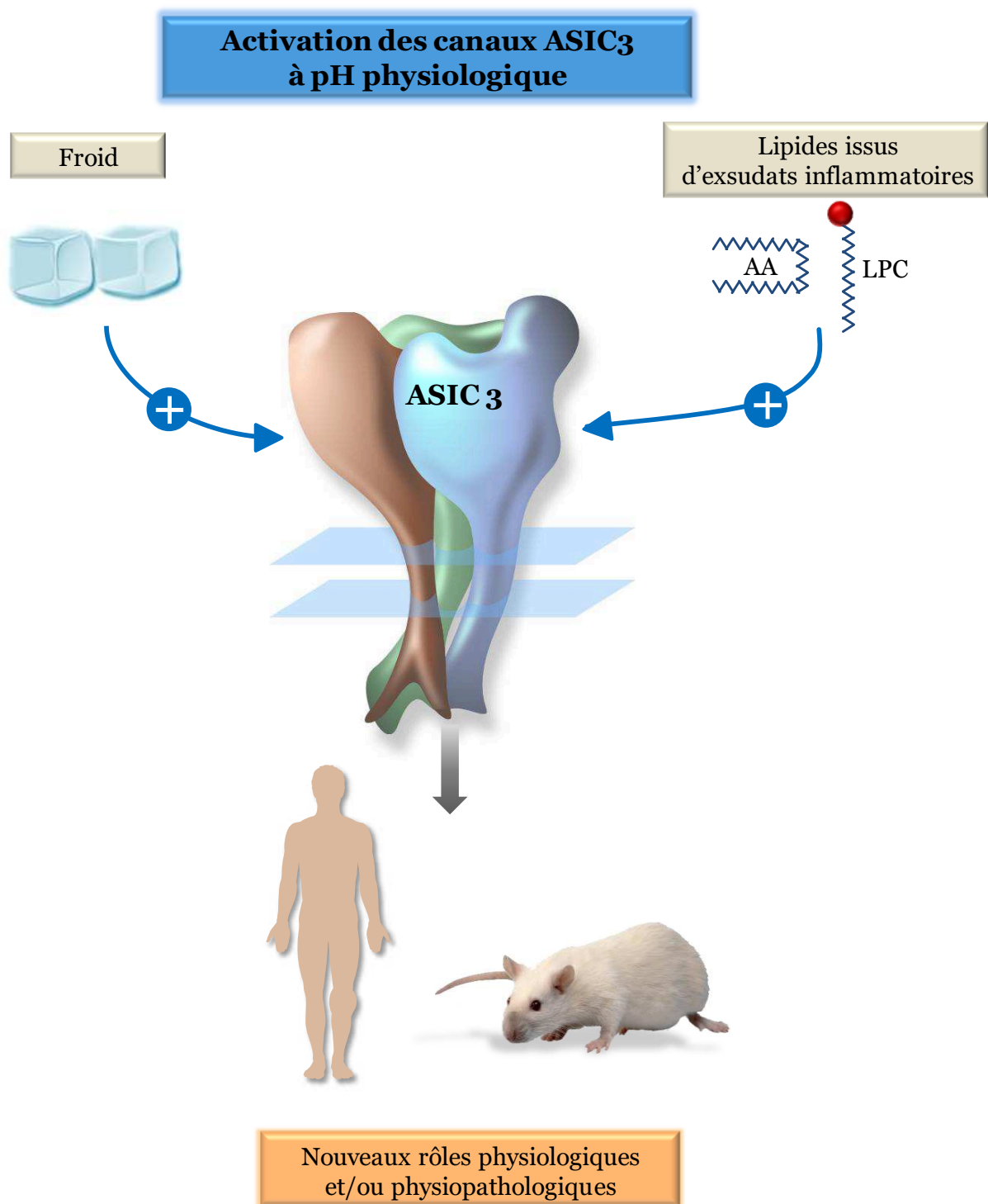


Figure 41 : Schéma de conclusion générale

ANNEXE : PARTICIPATIONS AUX CONGRÈS

Communications orales :

- 2nd Meeting des jeunes chercheurs du LabEx ICST - Octobre **2016**, Nice.
« Non-acidic activation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 3 by lipids ».
- 12^{ème} Congrès du réseau français Recherche-Douleur - Mars **2016**, Nice.
« Activation of ASIC3 by endogenous lipids without extracellular acidification ».
- 18^{ème} édition de la Semaine du Cerveau - Mars **2016**, Valbonne.
« Douleur : les nerfs à fleur de peau ».
- 2nd Meeting du LabEx ICST - Décembre **2015**, Montpellier.
« Non-acidic activation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 3 by lipids ».
- 1^{er} Meeting des jeunes chercheurs du LabEx ICST - Octobre **2015**, Lille.
« Activation of ASIC3 ion channel by endogenous lipids ».
- 25^{ème} Colloque des canaux ioniques - Septembre **2015**, Ile d'Oléron.
« Activation of ASIC3 ion channel by endogenous lipids ».
- 10^{ème} Congrès du réseau français Recherche-Douleur - Mars **2014**, Montpellier.
« Activation des canaux ASIC3 par des lipides endogènes ».

Communications affichées :

- 10^{ème} Forum FENS des Neurosciences - Juillet **2016**, Copenhague (Danemark).
« Activation of Acid-Sensing Ion Channel 3 by endogenous lipids without extracellular acidification ».
- 26^{ème} Colloque des canaux ioniques - Septembre **2015**, Sète.
« Endogenous lipids from human inflammatory exudates activate ASIC3 channels without any extracellular acidification ».
- 12^{ème} Colloque de la Société des Neurosciences - Mai **2015**, Montpellier.
« Effect of lipids on Acid-Sensing Ion Channel 3 and pain ».

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott FV, Hong Y, Blier P (1996) Activation of 5-HT_{2A} receptors potentiates pain produced by inflammatory mediators. *Neuropharmacology* 35: 99-110
- Abraira VE, Ginty DD (2013) The sensory neurons of touch. *Neuron* 79: 618-39
- Adams CM, Snyder PM, Welsh MJ (1999) Paradoxical stimulation of a DEG/ENaC channel by amiloride. *J Biol Chem* 274: 15500-4
- Akopian AN, Chen CC, Ding Y, Cesare P, Wood JN (2000) A new member of the acid-sensing ion channel family. *Neuroreport* 11: 2217-22
- Alijevic O, Kellenberger S (2012) Subtype-specific modulation of acid-sensing ion channel (ASIC) function by 2-guanidine-4-methylquinazoline. *J Biol Chem* 287: 36059-70
- Allard M, Rousselot P, Lombard MC, Theodosis DT (1999) Evidence for neuropeptide FF (FLFQRFamide) in rat dorsal root ganglia. *Peptides* 20: 327-33
- Allen NJ, Attwell D (2002) Modulation of ASIC channels in rat cerebellar Purkinje neurons by ischaemia-related signals. *J Physiol* 543: 521-9
- Allison MC, Howatson AG, Torrance CJ, Lee FD, Russell RI (1992) Gastrointestinal damage associated with the use of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med* 327: 749-54
- Alloui A, Zimmermann K, Mamet J, Duprat F, Noel J, Chemin J, Guy N, Blondeau N, Voilley N, Rubat-Coudert C, Borsotto M, Romey G, Heurteaux C, Reeh P, Eschalier A, Lazdunski M (2006) TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J* 25: 2368-76
- Alvarez de la Rosa D, Krueger SR, Kolar A, Shao D, Fitzsimonds RM, Canessa CM (2003) Distribution, subcellular localization and ontogeny of ASIC1 in the mammalian central nervous system. *J Physiol* 546: 77-87
- Anderson BJ (2008) Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action. *Paediatr Anaesth* 18: 915-21
- Andersson DA, Nash M, Bevan S (2007) Modulation of the cold-activated channel TRPM8 by lysophospholipids and polyunsaturated fatty acids. *J Neurosci* 27: 3347-55
- Andoh T, Kuraishi Y (2005) Expression of BLT1 leukotriene B₄ receptor on the dorsal root ganglion neurons in mice. *Brain Res Mol Brain Res* 137: 263-6
- Andreani M, Olivier JL, Berenbaum F, Raymondjean M, Bereziat G (2000) Transcriptional regulation of inflammatory secreted phospholipases A₂. *Biochim Biophys Acta* 1488: 149-58

Anzai N, Deval E, Schaefer L, Friend V, Lazdunski M, Lingueglia E (2002) The multivalent PDZ domain-containing protein CIPP is a partner of acid-sensing ion channel 3 in sensory neurons. *J Biol Chem* 277: 16655-61

Aoki J (2004) Mechanisms of lysophosphatidic acid production. *Semin Cell Dev Biol* 15: 477-89

Ardid D, Guilbaud G (1992) Antinociceptive effects of acute and 'chronic' injections of tricyclic antidepressant drugs in a new model of mononeuropathy in rats. *Pain* 49: 279-87

Askwith CC, Cheng C, Ikuma M, Benson C, Price MP, Welsh MJ (2000) Neuropeptide FF and FMRFamide potentiate acid-evoked currents from sensory neurons and proton-gated DEG/ENaC channels. *Neuron* 26: 133-41

Askwith CC, Benson CJ, Welsh MJ, Snyder PM (2001) DEG/ENaC ion channels involved in sensory transduction are modulated by cold temperature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6459-63

Askwith CC, Wemmie JA, Price MP, Rokhlina T, Welsh MJ (2004) Acid-sensing ion channel 2 (ASIC2) modulates ASIC1 H⁺-activated currents in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 279: 18296-305

Babini E, Paukert M, Geisler HS, Grunder S (2002) Alternative splicing and interaction with di- and polyvalent cations control the dynamic range of acid-sensing ion channel 1 (ASIC1). *J Biol Chem* 277: 41597-603

Babinski K, Le KT, Seguela P (1999) Molecular cloning and regional distribution of a human proton receptor subunit with biphasic functional properties. *J Neurochem* 72: 51-7

Babinski K, Catarsi S, Biagini G, Seguela P (2000) Mammalian ASIC2a and ASIC3 subunits co-assemble into heteromeric proton-gated channels sensitive to Gd³⁺. *J Biol Chem* 275: 28519-25

Baconguis I, Gouaux E (2012) Structural plasticity and dynamic selectivity of acid-sensing ion channel-spider toxin complexes. *Nature* 489: 400-5

Baconguis I, Bohlen CJ, Goehring A, Julius D, Gouaux E (2014) X-ray structure of acid-sensing ion channel 1-snake toxin complex reveals open state of a Na⁽⁺⁾-selective channel. *Cell* 156: 717-29

Baez A, Salceda E, Flo M, Grana M, Fernandez C, Vega R, Soto E (2015) alpha-Dendrotoxin inhibits the ASIC current in dorsal root ganglion neurons from rat. *Neurosci Lett* 606: 42-7

Baker DG, Coleridge HM, Coleridge JC, Nerdrum T (1980) Search for a cardiac nociceptor: stimulation by bradykinin of sympathetic afferent nerve endings in the heart of the cat. *J Physiol* 306: 519-36

- Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A (2004) Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 41: 849-57
- Barclay J, Patel S, Dorn G, Wotherspoon G, Moffatt S, Eunson L, Abdel'al S, Natt F, Hall J, Winter J, Bevan S, Wishart W, Fox A, Ganju P (2002) Functional downregulation of P2X3 receptor subunit in rat sensory neurons reveals a significant role in chronic neuropathic and inflammatory pain. *J Neurosci* 22: 8139-47
- Baron A, Schaefer L, Lingueglia E, Champigny G, Lazdunski M (2001) Zn²⁺ and H⁺ are coactivators of acid-sensing ion channels. *J Biol Chem* 276: 35361-7
- Baron A, Waldmann R, Lazdunski M (2002a) ASIC-like, proton-activated currents in rat hippocampal neurons. *J Physiol* 539: 485-94
- Baron A, Deval E, Salinas M, Lingueglia E, Voilley N, Lazdunski M (2002b) Protein kinase C stimulates the acid-sensing ion channel ASIC2a via the PDZ domain-containing protein PICK1. *J Biol Chem* 277: 50463-8
- Baron A, Voilley N, Lazdunski M, Lingueglia E (2008) Acid sensing ion channels in dorsal spinal cord neurons. *J Neurosci* 28: 1498-508
- Baron A, Diochot S, Salinas M, Deval E, Noel J, Lingueglia E (2013) Venom toxins in the exploration of molecular, physiological and pathophysiological functions of acid-sensing ion channels. *Toxicon* 75: 187-204
- Baron A, Lingueglia E (2015) Pharmacology of acid-sensing ion channels - Physiological and therapeutical perspectives. *Neuropharmacology* 94: 19-35
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139: 267-84
- Basbaum AI, Jessell TM (2013) Pain. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ, editors *Principles of Neural Science* 5th ed New York: McGraw-Hill Medical, 2013
- Bassilana F, Champigny G, Waldmann R, de Weille JR, Heurteaux C, Lazdunski M (1997) The acid-sensitive ionic channel subunit ASIC and the mammalian degenerin MDEG form a heteromultimeric H⁺-gated Na⁺ channel with novel properties. *J Biol Chem* 272: 28819-22
- Bassler EL, Ngo-Anh TJ, Geisler HS, Ruppersberg JP, Grunder S (2001) Molecular and functional characterization of acid-sensing ion channel (ASIC) 1b. *J Biol Chem* 276: 33782-7
- Baumann TK, Chaudhary P, Martenson ME (2004) Background potassium channel block and TRPV1 activation contribute to proton depolarization of sensory neurons from humans with neuropathic pain. *Eur J Neurosci* 19: 1343-51

Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, Hogestatt ED, Julius D, Jordt SE, Zygmunt PM (2005) Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 12248-52

Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI, Julius D (2006) TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124: 1269-82

Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, Tsuruda PR, Basbaum AI, Stucky CL, Jordt SE, Julius D (2007) The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* 448: 204-8

Belmonte C, Viana F (2008) Molecular and cellular limits to somatosensory specificity. *Mol Pain* 4: 14

Bennett DL, Woods CG (2014) Painful and painless channelopathies. *Lancet Neurol* 13: 587-99

Benson CJ, Eckert SP, McCleskey EW (1999) Acid-evoked currents in cardiac sensory neurons: A possible mediator of myocardial ischemic sensation. *Circ Res* 84: 921-8

Benson CJ, Xie J, Wemmie JA, Price MP, Henss JM, Welsh MJ, Snyder PM (2002) Heteromultimers of DEG/ENaC subunits form H⁺-gated channels in mouse sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2338-43

Berkley KJ, Robbins A, Sato Y (1988) Afferent fibers supplying the uterus in the rat. *J Neurophysiol* 59: 142-63

Bessou P, Perl ER (1969) Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *J Neurophysiol* 32: 1025-43

Bevan S, Yeats J (1991) Protons activate a cation conductance in a sub-population of rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol* 433: 145-61

Bianchi M, Rossoni G, Sacerdote P, Panerai AE (1999) Effects of tramadol on experimental inflammation. *Fundam Clin Pharmacol* 13: 220-5

Birdsong WT, Fierro L, Williams FG, Spelta V, Naves LA, Knowles M, Marsh-Haffner J, Adelman JP, Almers W, Elde RP, McCleskey EW (2010) Sensing muscle ischemia: coincident detection of acid and ATP via interplay of two ion channels. *Neuron* 68: 739-49

Bisgaard H, Kristensen JK (1985) Leukotriene B₄ produces hyperalgesia in humans. *Prostaglandins* 30: 791-7

Bjorkman R, Hallman KM, Hedner J, Hedner T, Henning M (1994) Acetaminophen blocks spinal hyperalgesia induced by NMDA and substance P. *Pain* 57: 259-64

Bjorkman R (1995) Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. Experimental studies in the rat. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 103: 1-44

Blanchard MG, Kellenberger S (2011) Effect of a temperature increase in the non-noxious range on proton-evoked ASIC and TRPV1 activity. *Pflugers Arch* 461: 123-39

Blanchard MG, Rash LD, Kellenberger S (2012) Inhibition of voltage-gated Na(+) currents in sensory neurones by the sea anemone toxin APETx2. *Br J Pharmacol* 165: 2167-77

Bleehen T, Keele CA (1977) Observations on the algogenic actions of adenosine compounds on the human blister base preparation. *Pain* 3: 367-77

Bohlen CJ, Chesler AT, Sharif-Naeini R, Medzihradsky KF, Zhou S, King D, Sanchez EE, Burlingame AL, Basbaum AI, Julius D (2011) A heteromeric Texas coral snake toxin targets acid-sensing ion channels to produce pain. *Nature* 479: 410-4

Bonifacio G, Lelli CI, Kellenberger S (2014) Protonation controls ASIC1a activity via coordinated movements in multiple domains. *J Gen Physiol* 143: 105-18

Boucherle B, Haudecoeur R, Queiroz EF, De Waard M, Wolfender JL, Robins RJ, Boumendjel A (2016) *Nauclea latifolia*: biological activity and alkaloid phytochemistry of a West African tree. *Nat Prod Rep* 33: 1034-43

Bouhassira D, Lanteri-Minet M, Attal N, Laurent B, Touboul C (2008) Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain* 136: 380-7

Boumendjel A, Sotoing Taiwe G, Ngo Bum E, Chabrol T, Beney C, Sinniger V, Haudecoeur R, Marcourt L, Challal S, Ferreira Queiroz E, Souard F, Le Borgne M, Lomberget T, Depaulis A, Lavaud C, Robins R, Wolfender JL, Bonaz B, De Waard M (2013) Occurrence of the synthetic analgesic tramadol in an African medicinal plant. *Angew Chem Int Ed Engl* 52: 11780-4

Boutaud O, Aronoff DM, Richardson JH, Marnett LJ, Oates JA (2002) Determinants of the cellular specificity of acetaminophen as an inhibitor of prostaglandin H(2) synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 7130-5

Brierley SM, Hughes PA, Harrington AM, Rychkov GY, Blackshaw LA (2010) Identifying the Ion Channels Responsible for Signaling Gastro-Intestinal Based Pain. *Pharmaceuticals (Basel)* 3: 2768-2798

Bromm B, Forth W, Richter E, Scharein E (1992) Effects of acetaminophen and antipyrine on non-inflammatory pain and EEG activity. *Pain* 50: 213-21

Brune K, Renner B, Tiegs G (2015) Acetaminophen/paracetamol: A history of errors, failures and false decisions. *Eur J Pain* 19: 953-65

Bujalska M (2004) Effect of nitric oxide synthase inhibition on antinociceptive action of different doses of acetaminophen. *Pol J Pharmacol* 56: 605-10

Burgard EC, Niforatos W, van Biesen T, Lynch KJ, Touma E, Metzger RE, Kowaluk EA, Jarvis MF (1999) P2X receptor-mediated ionic currents in dorsal root ganglion neurons. *J Neurophysiol* 82: 1590-8

Burstein R (2001) Deconstructing migraine headache into peripheral and central sensitization. *Pain* 89: 107-10

Bushra R, Aslam N (2010) An overview of clinical pharmacology of Ibuprofen. *Oman Med J* 25: 155-166

Cadiou H, Studer M, Jones NG, Smith ES, Ballard A, McMahon SB, McNaughton PA (2007) Modulation of acid-sensing ion channel activity by nitric oxide. *J Neurosci* 27: 13251-60

Cahusac PM, Noyce R (2007) A pharmacological study of slowly adapting mechanoreceptors responsive to cold thermal stimulation. *Neuroscience* 148: 489-500

Cain DM, Khasabov SG, Simone DA (2001) Response properties of mechanoreceptors and nociceptors in mouse glabrous skin: an in vivo study. *J Neurophysiol* 85: 1561-74

Campero M, Serra J, Bostock H, Ochoa JL (2001) Slowly conducting afferents activated by innocuous low temperature in human skin. *J Physiol* 535: 855-65

Canessa CM, Horisberger JD, Rossier BC (1993) Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. *Nature* 361: 467-70

Canning BJ, Farmer DG, Mori N (2006) Mechanistic studies of acid-evoked coughing in anesthetized guinea pigs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: R454-63

Caraco Y, Sheller J, Wood AJ (1996) Pharmacogenetic determination of the effects of codeine and prediction of drug interactions. *J Pharmacol Exp Ther* 278: 1165-74

Catarsi S, Babinski K, Seguela P (2001) Selective modulation of heteromeric ASIC proton-gated channels by neuropeptide FF. *Neuropharmacology* 41: 592-600

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-24

Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398: 436-41

Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeit KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288: 306-13

Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG (2005) International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 57: 397-409

Cervero F (1982) Afferent activity evoked by natural stimulation of the biliary system in the ferret. *Pain* 13: 137-51

Cervero F, Sann H (1989) Mechanically evoked responses of afferent fibres innervating the guinea-pig's ureter: an in vitro study. *J Physiol* 412: 245-66

- Cervero F, Janig W (1992) Visceral nociceptors: a new world order? *Trends Neurosci* 15: 374-8
- Chai S, Li M, Lan J, Xiong ZG, Saugstad JA, Simon RP (2007) A kinase-anchoring protein 150 and calcineurin are involved in regulation of acid-sensing ion channels ASIC1a and ASIC2a. *J Biol Chem* 282: 22668-77
- Chalfie M, Wolinsky E (1990) The identification and suppression of inherited neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 345: 410-6
- Champigny G, Voilley N, Waldmann R, Lazdunski M (1998) Mutations causing neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans* drastically alter the pH sensitivity and inactivation of the mammalian H⁺-gated Na⁺ channel MDEG1. *J Biol Chem* 273: 15418-22
- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 13926-31
- Chassagnon IR, McCarthy CA, Chin YK, Pineda SS, Keramidas A, Mobli M, Pham V, De Silva TM, Lynch JW, Widdop RE, Rash LD, King GF (2017) Potent neuroprotection after stroke afforded by a double-knot spider-venom peptide that inhibits acid-sensing ion channel 1a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: 3750-3755
- Chen CC, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood JN (1995) A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 377: 428-31
- Chen CC, England S, Akopian AN, Wood JN (1998) A sensory neuron-specific, proton-gated ion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10240-5
- Chen CC, Zimmer A, Sun WH, Hall J, Brownstein MJ, Zimmer A (2002) A role for ASIC3 in the modulation of high-intensity pain stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 8992-7
- Chen X, Kalbacher H, Grunder S (2005) The tarantula toxin psalmotoxin 1 inhibits acid-sensing ion channel (ASIC) 1a by increasing its apparent H⁺ affinity. *J Gen Physiol* 126: 71-9
- Chen X, Paukert M, Kadurin I, Pusch M, Grunder S (2006a) Strong modulation by RFamide neuropeptides of the ASIC1b/3 heteromer in competition with extracellular calcium. *Neuropharmacology* 50: 964-74
- Chen X, Kalbacher H, Grunder S (2006) Interaction of acid-sensing ion channel (ASIC) 1 with the tarantula toxin psalmotoxin 1 is state dependent. *J Gen Physiol* 127: 267-76
- Chen X, Grunder S (2007) Permeating protons contribute to tachyphylaxis of the acid-sensing ion channel (ASIC) 1a. *J Physiol* 579: 657-70

- Chen ZR, Irvine RJ, Somogyi AA, Bochner F (1991) Mu receptor binding of some commonly used opioids and their metabolites. *Life Sci* 48: 2165-71
- Chery-Croze S (1983) Painful sensation induced by a thermal cutaneous stimulus. *Pain* 17: 109-37
- Cho H, Yang YD, Lee J, Lee B, Kim T, Jang Y, Back SK, Na HS, Harfe BD, Wang F, Raouf R, Wood JN, Oh U (2012) The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons. *Nat Neurosci* 15: 1015-21
- Choi DW, Yokoyama M, Koh J (1988) Zinc neurotoxicity in cortical cell culture. *Neuroscience* 24: 67-79
- Chu XP, Wemmie JA, Wang WZ, Zhu XM, Saugstad JA, Price MP, Simon RP, Xiong ZG (2004) Subunit-dependent high-affinity zinc inhibition of acid-sensing ion channels. *J Neurosci* 24: 8678-89
- Cleary JF (2014) Are corticosteroids effective in all patients with cancer-related pain? *J Clin Oncol* 32: 3210-1
- Cobbe SM, Poole-Wilson PA (1982) Continuous coronary sinus and arterial pH monitoring during pacing-induced ischaemia in coronary artery disease. *Br Heart J* 47: 369-74
- Cockayne DA, Dunn PM, Zhong Y, Rong W, Hamilton SG, Knight GE, Ruan HZ, Ma B, Yip P, Nunn P, McMahon SB, Burnstock G, Ford AP (2005) P2X2 knockout mice and P2X2/P2X3 double knockout mice reveal a role for the P2X2 receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP. *J Physiol* 567: 621-39
- Cohen A, Ben-Abu Y, Hen S, Zilberberg N (2008) A novel mechanism for human K2P2.1 channel gating. Facilitation of C-type gating by protonation of extracellular histidine residues. *J Biol Chem* 283: 19448-55
- Cohen A, Sagron R, Somech E, Segal-Hayoun Y, Zilberberg N (2009) Pain-associated signals, acidosis and lysophosphatidic acid, modulate the neuronal K(2P)2.1 channel. *Mol Cell Neurosci* 40: 382-9
- Colburn RW, Lubin ML, Stone DJ, Jr., Wang Y, Lawrence D, D'Andrea MR, Brandt MR, Liu Y, Flores CM, Qin N (2007) Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron* 54: 379-86
- Cooper SA, Engel J, Ladov M, Precheur H, Rosenheck A, Rauch D (1982) Analgesic efficacy of an ibuprofen-codeine combination. *Pharmacotherapy* 2: 162-7
- Coric T, Zhang P, Todorovic N, Canessa CM (2003) The extracellular domain determines the kinetics of desensitization in acid-sensitive ion channel 1. *J Biol Chem* 278: 45240-7
- Coscoy S, Lingueglia E, Lazdunski M, Barbry P (1998) The Phe-Met-Arg-Phe-amide-activated sodium channel is a tetramer. *J Biol Chem* 273: 8317-22

Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F (2001) Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* 429: 161-76

Cruz-Orengo L, Dhaka A, Heuermann RJ, Young TJ, Montana MC, Cavanaugh EJ, Kim D, Story GM (2008) Cutaneous nociception evoked by 15-delta PGJ2 via activation of ion channel TRPA1. *Mol Pain* 4: 30

Cushman KA, Marsh-Haffner J, Adelman JP, McCleskey EW (2007) A conformation change in the extracellular domain that accompanies desensitization of acid-sensing ion channel (ASIC) 3. *J Gen Physiol* 129: 345-50

Dallob A, Guindon Y, Goldenberg MM (1987) Pharmacological evidence for a role of lipoxygenase products in platelet-activating factor (PAF)-induced hyperalgesia. *Biochem Pharmacol* 36: 3201-4

Darian-Smith I, Johnson KO, Dykes R (1973) "Cold" fiber population innervating palmar and digital skin of the monkey: responses to cooling pulses. *J Neurophysiol* 36: 325-46

Darian-Smith I, Johnson KO (1977) Thermal sensibility and thermoreceptors. *J Invest Dermatol* 69: 146-53

Darian-Smith I, Johnson KO, LaMotte C, Shigenaga Y, Kenins P, Champness P (1979) Warm fibers innervating palmar and digital skin of the monkey: responses to thermal stimuli. *J Neurophysiol* 42: 1297-315

Davies NW, Lux HD, Morad M (1988) Site and mechanism of activation of proton-induced sodium current in chick dorsal root ganglion neurones. *J Physiol* 400: 159-87

Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA (2000) Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405: 183-7

Davis KD, Meyer RA, Campbell JN (1993) Chemosensitivity and sensitization of nociceptive afferents that innervate the hairy skin of monkey. *J Neurophysiol* 69: 1071-81

Dawson RJ, Benz J, Stohler P, Tetaz T, Joseph C, Huber S, Schmid G, Hugin D, Pflimlin P, Trube G, Rudolph MG, Hennig M, Ruf A (2012) Structure of the acid-sensing ion channel 1 in complex with the gating modifier Psalmotoxin 1. *Nat Commun* 3: 936

de Craen AJ, Di Giulio G, Lampe-Schoenmaeckers JE, Kessels AG, Kleijnen J (1996) Analgesic efficacy and safety of paracetamol-codeine combinations versus paracetamol alone: a systematic review. *BMJ* 313: 321-5

de la Roche J, Eberhardt MJ, Klinger AB, Stanslowsky N, Wegner F, Koppert W, Reeh PW, Lampert A, Fischer MJ, Leffler A (2013) The molecular basis for species-specific activation of human TRPA1 protein by protons involves poorly conserved residues within transmembrane domains 5 and 6. *J Biol Chem* 288: 20280-92

de Oliveira CM, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomao R (2011) Cytokines and pain. *Rev Bras Anesthesiol* 61: 255-9, 260-5, 137-42

de Weille JR, Bassilana F, Lazdunski M, Waldmann R (1998) Identification, functional expression and chromosomal localisation of a sustained human proton-gated cation channel. *FEBS Lett* 433: 257-60

Delaunay A, Gasull X, Salinas M, Noel J, Friend V, Lingueglia E, Deval E (2012) Human ASIC3 channel dynamically adapts its activity to sense the extracellular pH in both acidic and alkaline directions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 13124-9

Della Vecchia MC, Rued AC, Carattino MD (2013) Gating transitions in the palm domain of ASIC1a. *J Biol Chem* 288: 5487-95

Delmas P, Hao J, Rodat-Despoix L (2011) Molecular mechanisms of mechanotransduction in mammalian sensory neurons. *Nat Rev Neurosci* 12: 139-53

Deo DD, Bazan NG, Hunt JD (2004) Activation of platelet-activating factor receptor-coupled G alpha q leads to stimulation of Src and focal adhesion kinase via two separate pathways in human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* 279: 3497-508

Deval E, Baron A, Lingueglia E, Mazarguil H, Zajac JM, Lazdunski M (2003) Effects of neuropeptide SF and related peptides on acid sensing ion channel 3 and sensory neuron excitability. *Neuropharmacology* 44: 662-71

Deval E, Salinas M, Baron A, Lingueglia E, Lazdunski M (2004) ASIC2b-dependent regulation of ASIC3, an essential acid-sensing ion channel subunit in sensory neurons via the partner protein PICK-1. *J Biol Chem* 279: 19531-9

Deval E, Friend V, Thirant C, Salinas M, Jodar M, Lazdunski M, Lingueglia E (2006) Regulation of sensory neuron-specific acid-sensing ion channel 3 by the adaptor protein Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor-1. *J Biol Chem* 281: 1796-807

Deval E, Noel J, Lay N, Alloui A, Diochot S, Friend V, Jodar M, Lazdunski M, Lingueglia E (2008) ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain. *EMBO J* 27: 3047-55

Deval E, Gasull X, Noel J, Salinas M, Baron A, Diochot S, Lingueglia E (2010) Acid-sensing ion channels (ASICs): pharmacology and implication in pain. *Pharmacol Ther* 128: 549-58

Deval E, Noel J, Gasull X, Delaunay A, Alloui A, Friend V, Eschalier A, Lazdunski M, Lingueglia E (2011) Acid-sensing ion channels in postoperative pain. *J Neurosci* 31: 6059-66

- Deval E, Lingueglia E (2015) Acid-Sensing Ion Channels and nociception in the peripheral and central nervous systems. *Neuropharmacology* 94: 49-57
- Devor M, Govrin-Lippmann R, Raber P (1985) Corticosteroids suppress ectopic neural discharge originating in experimental neuromas. *Pain* 22: 127-37
- Devor M (1999) Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. *Pain Suppl* 6: S27-35
- Dhaka A, Murray AN, Mathur J, Earley TJ, Petrus MJ, Patapoutian A (2007) TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron* 54: 371-8
- Dickenson AH, Ghandehari J (2007) Anti-convulsants and anti-depressants. *Handb Exp Pharmacol*: 145-77
- Diochot S, Baron A, Rash LD, Deval E, Escoubas P, Scarzello S, Salinas M, Lazdunski M (2004) A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *EMBO J* 23: 1516-25
- Diochot S, Baron A, Salinas M, Douguet D, Scarzello S, Dabert-Gay AS, Debayle D, Friend V, Alloui A, Lazdunski M, Lingueglia E (2012) Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain. *Nature* 490: 552-5
- Diochot S, Alloui A, Rodrigues P, Dauvois M, Friend V, Aissouni Y, Eschalier A, Lingueglia E, Baron A (2016) Analgesic effects of mambalgins peptide inhibitors of acid-sensing ion channels in inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 157: 552-9
- Dittert I, Benedikt J, Vyklicky L, Zimmermann K, Reeh PW, Vlachova V (2006) Improved superfusion technique for rapid cooling or heating of cultured cells under patch-clamp conditions. *J Neurosci Methods* 151: 178-85
- Djoughri L, Lawson SN (2004) Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res Brain Res Rev* 46: 131-45
- Donier E, Rugiero F, Okuse K, Wood JN (2005) Annexin II light chain p11 promotes functional expression of acid-sensing ion channel ASIC1a. *J Biol Chem* 280: 38666-72
- Dorofeeva NA, Barygin OI, Staruschenko A, Bolshakov KV, Magazanik LG (2008) Mechanisms of non-steroid anti-inflammatory drugs action on ASICs expressed in hippocampal interneurons. *J Neurochem* 106: 429-41
- Douglas WW, Ritchie JM, Straub RW (1960) The role of nonmyelinated fibres in signalling cooling of the skin. *J Physiol* 150: 266-83
- Drew LJ, Rohrer DK, Price MP, Blaver KE, Cockayne DA, Cesare P, Wood JN (2004) Acid-sensing ion channels ASIC2 and ASIC3 do not contribute to mechanically activated currents in mammalian sensory neurones. *J Physiol* 556: 691-710

Driscoll M, Chalfie M (1991) The *mec-4* gene is a member of a family of *Caenorhabditis elegans* genes that can mutate to induce neuronal degeneration. *Nature* 349: 588-93

Du J, Reznikov LR, Welsh MJ (2014) Expression and activity of acid-sensing ion channels in the mouse anterior pituitary. *PLoS One* 9: e115310

Duan B, Wu LJ, Yu YQ, Ding Y, Jing L, Xu L, Chen J, Xu TL (2007) Upregulation of acid-sensing ion channel ASIC1a in spinal dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *J Neurosci* 27: 11139-48

Duan B, Wang YZ, Yang T, Chu XP, Yu Y, Huang Y, Cao H, Hansen J, Simon RP, Zhu MX, Xiong ZG, Xu TL (2011) Extracellular spermine exacerbates ischemic neuronal injury through sensitization of ASIC1a channels to extracellular acidosis. *J Neurosci* 31: 2101-12

Dube GR, Lehto SG, Breese NM, Baker SJ, Wang X, Matulenko MA, Honore P, Stewart AO, Moreland RB, Brioni JD (2005) Electrophysiological and in vivo characterization of A-317567, a novel blocker of acid sensing ion channels. *Pain* 117: 88-96

Dubin AE, Patapoutian A (2010) Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest* 120: 3760-72

Dubner R, Sumino R, Wood WI (1975) A peripheral "cold" fiber population responsive to innocuous and noxious thermal stimuli applied to monkey's face. *J Neurophysiol* 38: 1373-89

Duggan A, Garcia-Anoveros J, Corey DP (2002) The PDZ domain protein PICK1 and the sodium channel BNaC1 interact and localize at mechanosensory terminals of dorsal root ganglion neurons and dendrites of central neurons. *J Biol Chem* 277: 5203-8

Dussor G (2015) ASICs as therapeutic targets for migraine. *Neuropharmacology* 94: 64-71

Elliott GR, Lauwen AP, Bonta IL (1991) Leukotriene B₄ stimulation of macrophage cyclooxygenase metabolite synthesis. *Agents Actions* 32: 73-4

Er SY, Cristofori-Armstrong B, Escoubas P, Rash LD (2017) Discovery and molecular interaction studies of a highly stable, tarantula peptide modulator of acid-sensing ion channel 1. *Neuropharmacology*

Erpelding N, Moayed M, Davis KD (2012) Cortical thickness correlates of pain and temperature sensitivity. *Pain* 153: 1602-9

Escoubas P, De Weille JR, Lecoq A, Diochot S, Waldmann R, Champigny G, Moinier D, Menez A, Lazdunski M (2000) Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na⁺ channels. *J Biol Chem* 275: 25116-21

Eshcol JO, Harding AM, Hattori T, Costa V, Welsh MJ, Benson CJ (2008) Acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) cell surface expression is modulated by PSD-95 within lipid rafts. *Am J Physiol Cell Physiol* 295: C732-9

Evans AR, Vasko MR, Nicol GD (1999) The cAMP transduction cascade mediates the PGE₂-induced inhibition of potassium currents in rat sensory neurones. *J Physiol* 516 (Pt 1): 163-78

Fein A (2012) Nociceptors and the perception of pain.

Fernandes ES, Passos GF, Campos MM, Araujo JG, Pesquero JL, Avelllar MC, Teixeira MM, Calixto JB (2003) Mechanisms underlying the modulatory action of platelet activating factor (PAF) on the upregulation of kinin B1 receptors in the rat paw. *Br J Pharmacol* 139: 973-81

Ferrandiz-Huertas C, Mathivanan S, Wolf CJ, Devesa I, Ferrer-Montiel A (2014) Trafficking of ThermoTRP Channels. *Membranes (Basel)* 4: 525-64

Ferreira SH (1972) Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nat New Biol* 240: 200-3

Fields H (2004) State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci* 5: 565-75

Fink M, Lesage F, Duprat F, Heurteaux C, Reyes R, Fosset M, Lazdunski M (1998) A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J* 17: 3297-308

Flower RJ, Vane JR (1972) Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). *Nature* 240: 410-1

Frelin C, Barbry P, Vigne P, Chassande O, Cragoe EJ, Jr., Lazdunski M (1988) Amiloride and its analogs as tools to inhibit Na⁺ transport via the Na⁺ channel, the Na⁺/H⁺ antiport and the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Biochimie* 70: 1285-90

Frey EN, Pavlovicz RE, Wegman CJ, Li C, Askwith CC (2013) Conformational changes in the lower palm domain of ASIC1a contribute to desensitization and RFamide modulation. *PLoS One* 8: e71733

Frey Law LA, Sluka KA, McMullen T, Lee J, Arendt-Nielsen L, Graven-Nielsen T (2008) Acidic buffer induced muscle pain evokes referred pain and mechanical hyperalgesia in humans. *Pain* 140: 254-64

Fromy B, Lingueglia E, Sigaud-Roussel D, Saumet JL, Lazdunski M (2012) Asic3 is a neuronal mechanosensor for pressure-induced vasodilation that protects against pressure ulcers. *Nat Med* 18: 1205-7

Fu LW, Longhurst JC (2010) Bradykinin and thromboxane A₂ reciprocally interact to synergistically stimulate cardiac spinal afferents during myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H235-44

- Fukuda T, Ichikawa H, Terayama R, Yamaai T, Kuboki T, Sugimoto T (2006) ASIC3-immunoreactive neurons in the rat vagal and glossopharyngeal sensory ganglia. *Brain Res* 1081: 150-5
- 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: 133-40
- Gao Z, Henig O, Kehoe V, Sinoway LI, Li J (2006) Vanilloid type 1 receptor and the acid-sensing ion channel mediate acid phosphate activation of muscle afferent nerves in rats. *J Appl Physiol* (1985) 100: 421-6
- Garber K (2003) Why it hurts: researchers seek mechanisms of cancer pain. *J Natl Cancer Inst* 95: 770-2
- Garcia-Anoveros J, Corey DP (1997) The molecules of mechanosensation. *Annu Rev Neurosci* 20: 567-94
- Garcia-Anoveros J, Derfler B, Neville-Golden J, Hyman BT, Corey DP (1997) BNaC1 and BNaC2 constitute a new family of human neuronal sodium channels related to degenerins and epithelial sodium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 1459-64
- Garcia-Anoveros J, Samad TA, Zúvela-Jelaska L, Woolf CJ, Corey DP (2001) Transport and localization of the DEG/ENaC ion channel BNaC1alpha to peripheral mechanosensory terminals of dorsal root ganglia neurons. *J Neurosci* 21: 2678-86
- Gardner E, Johnson KO (2013) The Somatosensory System: Receptors and Central Pathways. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ, editors *Principles of Neural Science* 5th ed New York: McGraw-Hill Medical, 2013
- Gasser H (1941) The Classification of Nerve Fibers. *The Ohio Journal of Science* 41: 145-159
- Gautam M, Benson CJ (2013) Acid-sensing ion channels (ASICs) in mouse skeletal muscle afferents are heteromers composed of ASIC1a, ASIC2, and ASIC3 subunits. *FASEB J* 27: 793-802
- Gebhart GF (1996) Visceral polymodal receptors. *Prog Brain Res* 113: 101-12
- Gentry C, Stoakley N, Andersson DA, Bevan S (2010) The roles of iPLA2, TRPM8 and TRPA1 in chemically induced cold hypersensitivity. *Mol Pain* 6: 4
- Glitzer MS, Steelman SL (1966) N-Amidino-3,5-diamino-6-chloropyrazine-carboxamide: an active diuretic in the carboxamide series. *Nature* 212: 191-3
- Gonzales EB, Kawate T, Gouaux E (2009) Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors. *Nature* 460: 599-604
- Gottschalk A, Smith DS (2001) New concepts in acute pain therapy: preemptive analgesia. *Am Fam Physician* 63: 1979-84
- Grunder S, Geissler HS, Bassler EL, Ruppertsberg JP (2000) A new member of acid-sensing ion channels from pituitary gland. *Neuroreport* 11: 1607-11

- Gu Q, Lee LY (2006) Characterization of acid signaling in rat vagal pulmonary sensory neurons. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291: L58-65
- Guler AD, Lee H, Iida T, Shimizu I, Tominaga M, Caterina M (2002) Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci* 22: 6408-14
- Habler HJ, Janig W, Koltzenburg M (1990) Activation of unmyelinated afferent fibres by mechanical stimuli and inflammation of the urinary bladder in the cat. *J Physiol* 425: 545-62
- Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B (1975) Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 2994-8
- Hamilton GR, Baskett TF (2000) In the arms of Morpheus the development of morphine for postoperative pain relief. *Can J Anaesth* 47: 367-74
- Hamilton SG, Warburton J, Bhattacharjee A, Ward J, McMahon SB (2000) ATP in human skin elicits a dose-related pain response which is potentiated under conditions of hyperalgesia. *Brain* 123 (Pt 6): 1238-46
- Han L, Ma C, Liu Q, Weng HJ, Cui Y, Tang Z, Kim Y, Nie H, Qu L, Patel KN, Li Z, McNeil B, He S, Guan Y, Xiao B, Lamotte RH, Dong X (2013) A subpopulation of nociceptors specifically linked to itch. *Nat Neurosci* 16: 174-82
- Hansen JM, Baca SM, Vanvalkenburgh P, Charles A (2013) Distinctive anatomical and physiological features of migraine aura revealed by 18 years of recording. *Brain* 136: 3589-95
- Hasegawa S, Kohro Y, Shiratori M, Ishii S, Shimizu T, Tsuda M, Inoue K (2010) Role of PAF receptor in proinflammatory cytokine expression in the dorsal root ganglion and tactile allodynia in a rodent model of neuropathic pain. *PLoS One* 5: e10467
- Hattori T, Chen J, Harding AM, Price MP, Lu Y, Abboud FM, Benson CJ (2009) ASIC2a and ASIC3 heteromultimerize to form pH-sensitive channels in mouse cardiac dorsal root ganglia neurons. *Circ Res* 105: 279-86
- Hensel H, Zotterman Y (1951) The response of mechanoreceptors to thermal stimulation. *J Physiol* 115: 16-24
- Hensel H, Iggo A, Witt I (1960) A quantitative study of sensitive cutaneous thermoreceptors with C afferent fibres. *J Physiol* 153: 113-26
- Hensel H, Iggo A (1971) Analysis of cutaneous warm and cold fibres in primates. *Pflugers Arch* 329: 1-8
- Hesselager M, Timmermann DB, Ahring PK (2004) pH Dependency and desensitization kinetics of heterologously expressed combinations of acid-sensing ion channel subunits. *J Biol Chem* 279: 11006-15
- Hildebrand C, Oqvist G, Brax L, Tuisku F (1991) Anatomy of the rat knee joint and fibre composition of a major articular nerve. *Anat Rec* 229: 545-55

Hogestatt ED, Jonsson BA, Ermund A, Andersson DA, Bjork H, Alexander JP, Cravatt BF, Basbaum AI, Zygmunt PM (2005) Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. *J Biol Chem* 280: 31405-12

Holland PR, Akerman S, Andreou AP, Karsan N, Wemmie JA, Goadsby PJ (2012) Acid-sensing ion channel 1: a novel therapeutic target for migraine with aura. *Ann Neurol* 72: 559-63

Holthusen H, Arndt JO (1994) Nitric oxide evokes pain in humans on intracutaneous injection. *Neurosci Lett* 165: 71-4

Honore P, Kage K, Mikusa J, Watt AT, Johnston JF, Wyatt JR, Faltynek CR, Jarvis MF, Lynch K (2002) Analgesic profile of intrathecal P2X(3) antisense oligonucleotide treatment in chronic inflammatory and neuropathic pain states in rats. *Pain* 99: 11-9

Hruska-Hageman AM, Wemmie JA, Price MP, Welsh MJ (2002) Interaction of the synaptic protein PICK1 (protein interacting with C kinase 1) with the non-voltage gated sodium channels BNC1 (brain Na⁺ channel 1) and ASIC (acid-sensing ion channel). *Biochem J* 361: 443-50

Hruska-Hageman AM, Benson CJ, Leonard AS, Price MP, Welsh MJ (2004) PSD-95 and Lin-7b interact with acid-sensing ion channel-3 and have opposite effects on H⁺-gated current. *J Biol Chem* 279: 46962-8

Huang SM, Li X, Yu Y, Wang J, Caterina MJ (2011) TRPV3 and TRPV4 ion channels are not major contributors to mouse heat sensation. *Mol Pain* 7: 37

Hughes PA, Brierley SM, Young RL, Blackshaw LA (2007) Localization and comparative analysis of acid-sensing ion channel (ASIC1, 2, and 3) mRNA expression in mouse colonic sensory neurons within thoracolumbar dorsal root ganglia. *J Comp Neurol* 500: 863-75

Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U (2000) Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6155-60

Iggo A (1959) Cutaneous heat and cold receptors with slowly conducting (C) afferent fibres. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 44: 362-70

Ikeuchi M, Kolker SJ, Burnes LA, Walder RY, Sluka KA (2008) Role of ASIC3 in the primary and secondary hyperalgesia produced by joint inflammation in mice. *Pain* 137: 662-9

Ikeuchi M, Kolker SJ, Sluka KA (2009) Acid-sensing ion channel 3 expression in mouse knee joint afferents and effects of carrageenan-induced arthritis. *J Pain* 10: 336-42

Immke DC, McCleskey EW (2001a) ASIC3: a lactic acid sensor for cardiac pain. *ScientificWorldJournal* 1: 510-2

- Immke DC, McCleskey EW (2001b) Lactate enhances the acid-sensing Na⁺ channel on ischemia-sensing neurons. *Nat Neurosci* 4: 869-70
- Immke DC, McCleskey EW (2003) Protons open acid-sensing ion channels by catalyzing relief of Ca²⁺ blockade. *Neuron* 37: 75-84
- Inoue M, Rashid MH, Fujita R, Contos JJ, Chun J, Ueda H (2004) Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling. *Nat Med* 10: 712-8
- Inoue M, Xie W, Matsushita Y, Chun J, Aoki J, Ueda H (2008) Lysophosphatidylcholine induces neuropathic pain through an action of autotaxin to generate lysophosphatidic acid. *Neuroscience* 152: 296-8
- Ishibashi K, Marumo F (1998) Molecular cloning of a DEG/ENaC sodium channel cDNA from human testis. *Biochem Biophys Res Commun* 245: 589-93
- Issberner U, Reeh PW, Steen KH (1996) Pain due to tissue acidosis: a mechanism for inflammatory and ischemic myalgia? *Neurosci Lett* 208: 191-4
- Izumi M, Ikeuchi M, Ji Q, Tani T (2012) Local ASIC3 modulates pain and disease progression in a rat model of osteoarthritis. *J Biomed Sci* 19: 77
- Jackson CH, MacDonald NC, Cornett JW (1984) Acetaminophen: a practical pharmacologic overview. *Can Med Assoc J* 131: 25-32, 37
- Jacobus WE, Taylor GJt, Hollis DP, Nunnally RL (1977) Phosphorus nuclear magnetic resonance of perfused working rat hearts. *Nature* 265: 756-8
- Jalalvand E, Robertson B, Wallen P, Grillner S (2016) Ciliated neurons lining the central canal sense both fluid movement and pH through ASIC3. *Nat Commun* 7: 10002
- Jasti J, Furukawa H, Gonzales EB, Gouaux E (2007) Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature* 449: 316-23
- Jensen JE, Cristofori-Armstrong B, Anangi R, Rosengren KJ, Lau CH, Mobli M, Brust A, Alewood PF, King GF, Rash LD (2014) Understanding the molecular basis of toxin promiscuity: the analgesic sea anemone peptide APETx2 interacts with acid-sensing ion channel 3 and hERG channels via overlapping pharmacophores. *J Med Chem* 57: 9195-203
- Jin X, Gereau RWt (2006) Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor- α . *J Neurosci* 26: 246-55
- Joeres N, Augustinowski K, Neuhof A, Assmann M, Grunder S (2016) Functional and pharmacological characterization of two different ASIC1a/2a heteromers reveals their sensitivity to the spider toxin PcTx1. *Sci Rep* 6: 27647
- Jones NG, Slater R, Cadiou H, McNaughton P, McMahon SB (2004) Acid-induced pain and its modulation in humans. *J Neurosci* 24: 10974-9

- Jones RC, 3rd, Xu L, Gebhart GF (2005) The mechanosensitivity of mouse colon afferent fibers and their sensitization by inflammatory mediators require transient receptor potential vanilloid 1 and acid-sensing ion channel 3. *J Neurosci* 25: 10981-9
- Jones RC, 3rd, Otsuka E, Wagstrom E, Jensen CS, Price MP, Gebhart GF (2007) Short-term sensitization of colon mechanoreceptors is associated with long-term hypersensitivity to colon distention in the mouse. *Gastroenterology* 133: 184-94
- Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413: 203-10
- Kabarowski JH, Zhu K, Le LQ, Witte ON, Xu Y (2001) Lysophosphatidylcholine as a ligand for the immunoregulatory receptor G2A. *Science* 293: 702-5
- Kalso E (2005) Oxycodone. *J Pain Symptom Manage* 29: S47-56
- Kang D, Choe C, Kim D (2005) Thermosensitivity of the two-pore domain K⁺ channels TREK-2 and TRAAK. *J Physiol* 564: 103-16
- Kang S, Jang JH, Price MP, Gautam M, Benson CJ, Gong H, Welsh MJ, Brennan TJ (2012) Simultaneous disruption of mouse ASIC1a, ASIC2 and ASIC3 genes enhances cutaneous mechanosensitivity. *PLoS One* 7: e35225
- Karashima Y, Talavera K, Everaerts W, Janssens A, Kwan KY, Vennekens R, Nilius B, Voets T (2009) TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1273-8
- Karczewski J, Spencer RH, Garsky VM, Liang A, Leitzl MD, Cato MJ, Cook SP, Kane S, Urban MO (2010) Reversal of acid-induced and inflammatory pain by the selective ASIC3 inhibitor, APETx2. *Br J Pharmacol* 161: 950-60
- Kassuya CA, Ferreira J, Claudino RF, Calixto JB (2007) Intraplantar PGE₂ causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. *Br J Pharmacol* 150: 727-37
- Kellenberger S, Schild L (2002) Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol Rev* 82: 735-67
- Kenshalo DR, Duclaux R (1977) Response characteristics of cutaneous cold receptors in the monkey. *J Neurophysiol* 40: 319-32
- Kerckhove N, Mallet C, Francois A, Boudes M, Chemin J, Voets T, Bourinet E, Alloui A, Eschalier A (2014) Ca_v3.2 calcium channels: the key protagonist in the supraspinal effect of paracetamol. *Pain* 155: 764-72
- Kim Y, Gnatenco C, Bang H, Kim D (2001) Localization of TREK-2 K⁺ channel domains that regulate channel kinetics and sensitivity to pressure, fatty acids and pH_i. *Pflugers Arch* 442: 952-60
- Kis B, Snipes JA, Busija DW (2005) Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. *J Pharmacol Exp Ther* 315: 1-7

Kleyman TR, Cragoe EJ, Jr. (1988) Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J Membr Biol* 105: 1-21

Knowlton WM, Bifolck-Fisher A, Bautista DM, McKemy DD (2010) TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics in vivo. *Pain* 150: 340-50

Kolesnikov YA, Wilson RS, Pasternak GW (2003) The synergistic analgesic interactions between hydrocodone and ibuprofen. *Anesth Analg* 97: 1721-3

Kollarik M, Undem BJ (2002) Mechanisms of acid-induced activation of airway afferent nerve fibres in guinea-pig. *J Physiol* 543: 591-600

Kollert S, Dombert B, Doring F, Wischmeyer E (2015) Activation of TRESK channels by the inflammatory mediator lysophosphatidic acid balances nociceptive signalling. *Sci Rep* 5: 12548

Konietzny F, Hensel H (1975) Letters and notes: Warm fiber activity in human skin nerves. *Pflugers Arch* 359: 265-7

Korkushko AO, Kryshchal OA (1984) [Blocking of proton-activated sodium permeability of the membranes of trigeminal ganglion neurons in the rat by organic cations]. *Neirofiziologiya* 16: 557-61

Kovalchuk Yu N, Krishtal OA, Nowycky MC (1990) The proton-activated inward current of rat sensory neurons includes a calcium component. *Neurosci Lett* 115: 237-42

Kozlenkov A, Lapatsina L, Lewin GR, Smith ES (2014) Subunit-specific inhibition of acid sensing ion channels by stomatin-like protein 1. *J Physiol* 592: 557-69

Kozlov SA, Osmakov DI, Andreev Ia A, Koshelev SG, Gladkikh IN, Monastyrnaia MM, Kozlovskaya EP, Grishin EV (2012) [Polypeptide toxin from sea anemone inhibiting proton-sensitive channel ASIC3]. *Bioorg Khim* 38: 653-9

Krauson AJ, Carattino MD (2016) The Thumb Domain Mediates Acid-sensing Ion Channel Desensitization. *J Biol Chem* 291: 11407-19

Krauson AJ, Rued AC, Carattino MD (2013) Independent contribution of extracellular proton binding sites to ASIC1a activation. *J Biol Chem* 288: 34375-83

Krishtal OA, Pidoplichko VI (1980) A receptor for protons in the nerve cell membrane. *Neuroscience* 5: 2325-7

Krishtal OA, Pidoplichko VI (1981a) Receptor for protons in the membrane of sensory neurons. *Brain Res* 214: 150-4

Krishtal OA, Pidoplichko VI (1981b) A receptor for protons in the membrane of sensory neurons may participate in nociception. *Neuroscience* 6: 2599-601

Kumazawa T, Mizumura K (1977) The polymodal receptors in the testis of dog. *Brain Res* 136: 553-8

- Kumazawa T, Mizumura K (1980a) Chemical responses of polymodal receptors of the scrotal contents in dogs. *J Physiol* 299: 219-31
- Kumazawa T, Mizumura K (1980b) Mechanical and thermal responses of polymodal receptors recorded from the superior spermatic nerve of dogs. *J Physiol* 299: 233-45
- Kusari S, Tatsimo SJ, Zuhlke S, Talontsi FM, Kouam SF, Spiteller M (2014) Tramadol--a true natural product? *Angew Chem Int Ed Engl* 53: 12073-6
- Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang DS, Woolf CJ, Corey DP (2006) TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* 50: 277-89
- Lallemend F, Ernfors P (2012) Molecular interactions underlying the specification of sensory neurons. *Trends Neurosci* 35: 373-81
- Lambeau G, Gelb MH (2008) Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annu Rev Biochem* 77: 495-520
- LaMotte RH, Campbell JN (1978) Comparison of responses of warm and nociceptive C-fiber afferents in monkey with human judgments of thermal pain. *J Neurophysiol* 41: 509-28
- LaMotte RH, Thalhammer JG (1982) Response properties of high-threshold cutaneous cold receptors in the primate. *Brain Res* 244: 279-87
- Langford LA (1983) Unmyelinated axon ratios in cat motor, cutaneous and articular nerves. *Neurosci Lett* 40: 19-22
- Lapatsina L, Jira JA, Smith ES, Poole K, Kozlenkov A, Bilbao D, Lewin GR, Heppenstall PA (2012) Regulation of ASIC channels by a stomatin/STOML3 complex located in a mobile vesicle pool in sensory neurons. *Open Biol* 2: 120096
- Latorre R, Zaelzer C, Brauchi S (2009) Structure-functional intimacies of transient receptor potential channels. *Q Rev Biophys* 42: 201-46
- Lazorthes Y (2009) Evolution de la prise en charge de la douleur dans l'histoire de la médecine.
- Lechner SG, Lewin GR (2013) Hairy sensation. *Physiology (Bethesda)* 28: 142-50
- Lee B, Cho H, Jung J, Yang YD, Yang DJ, Oh U (2014) Anoctamin 1 contributes to inflammatory and nerve-injury induced hypersensitivity. *Mol Pain* 10: 5
- Lee M, Silverman SM, Hansen H, Patel VB, Manchikanti L (2011) A comprehensive review of opioid-induced hyperalgesia. *Pain Physician* 14: 145-61
- Lee Y, Lee CH, Oh U (2005) Painful channels in sensory neurons. *Mol Cells* 20: 315-24

Leffler A, Monter B, Koltzenburg M (2006) The role of the capsaicin receptor TRPV1 and acid-sensing ion channels (ASICs) in proton sensitivity of subpopulations of primary nociceptive neurons in rats and mice. *Neuroscience* 139: 699-709

Leipold E, Liebmann L, Korenke GC, Heinrich T, Giesselmann S, Baets J, Ebbinghaus M, Goral RO, Stodberg T, Hennings JC, Bergmann M, Altmüller J, Thiele H, Wetzel A, Nurnberg P, Timmerman V, De Jonghe P, Blum R, Schaible HG, Weis J et al. (2013) A de novo gain-of-function mutation in SCN11A causes loss of pain perception. *Nat Genet* 45: 1399-404

Leonard AS, Yermolaieva O, Hruska-Hageman A, Askwith CC, Price MP, Wemmie JA, Welsh MJ (2003) cAMP-dependent protein kinase phosphorylation of the acid-sensing ion channel-1 regulates its binding to the protein interacting with C-kinase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2029-34

Leppert W (2009) Tramadol as an analgesic for mild to moderate cancer pain. *Pharmacol Rep* 61: 978-92

Leppert W, Buss T (2012) The role of corticosteroids in the treatment of pain in cancer patients. *Curr Pain Headache Rep* 16: 307-13

Levine JD, Lau W, Kwiat G, Goetzl EJ (1984) Leukotriene B₄ produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leukocytes. *Science* 225: 743-5

Lewin GR, Ritter AM, Mendell LM (1993) Nerve growth factor-induced hyperalgesia in the neonatal and adult rat. *J Neurosci* 13: 2136-48

Lewis C, Neidhart S, Holy C, North RA, Buell G, Surprenant A (1995) Coexpression of P2X₂ and P2X₃ receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 377: 432-5

Lewis T, Love WS (1926) *Heart* 13

Li L, Rutlin M, Abaira VE, Cassidy C, Kus L, Gong S, Jankowski MP, Luo W, Heintz N, Koerber HR, Woodbury CJ, Ginty DD (2011) The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons. *Cell* 147: 1615-27

Li T, Yang Y, Canessa CM (2010a) Two residues in the extracellular domain convert a nonfunctional ASIC1 into a proton-activated channel. *Am J Physiol Cell Physiol* 299: C66-73

Li T, Yang Y, Canessa CM (2010b) Asn415 in the beta11-beta12 linker decreases proton-dependent desensitization of ASIC1. *J Biol Chem* 285: 31285-91

Li WG, Yu Y, Zhang ZD, Cao H, Xu TL (2010) ASIC3 channels integrate agmatine and multiple inflammatory signals through the nonproton ligand sensing domain. *Mol Pain* 6: 88

Libert F, Adam F, Eschalier A, Brasseur L (2006) Les médicaments adjuvants (ou co-analgésiques). *Douleur et Analgésie* 4: 91-97

Liechti LA, Berneche S, Bargeton B, Iwaszkiewicz J, Roy S, Michielin O, Kellenberger S (2010) A combined computational and functional approach identifies new residues involved in pH-dependent gating of ASIC1a. *J Biol Chem* 285: 16315-29

Lin SH, Cheng YR, Banks RW, Min MY, Bewick GS, Chen CC (2016) Evidence for the involvement of ASIC3 in sensory mechanotransduction in proprioceptors. *Nat Commun* 7: 11460

Lin YW, Min MY, Lin CC, Chen WN, Wu WL, Yu HM, Chen CC (2008) Identification and characterization of a subset of mouse sensory neurons that express acid-sensing ion channel 3. *Neuroscience* 151: 544-57

Lingueglia E, Voilley N, Waldmann R, Lazdunski M, Barbry P (1993) Expression cloning of an epithelial amiloride-sensitive Na⁺ channel. A new channel type with homologies to *Caenorhabditis elegans* degenerins. *FEBS Lett* 318: 95-9

Lingueglia E, Champigny G, Lazdunski M, Barbry P (1995) Cloning of the amiloride-sensitive FMRFamide peptide-gated sodium channel. *Nature* 378: 730-3

Lingueglia E, de Weille JR, Bassilana F, Heurteaux C, Sakai H, Waldmann R, Lazdunski M (1997) A modulatory subunit of acid sensing ion channels in brain and dorsal root ganglion cells. *J Biol Chem* 272: 29778-83

Lingueglia E, Deval E, Lazdunski M (2006) FMRFamide-gated sodium channel and ASIC channels: a new class of ionotropic receptors for FMRFamide and related peptides. *Peptides* 27: 1138-52

Lingueglia E (2007) Acid-sensing ion channels in sensory perception. *J Biol Chem* 282: 17325-9

Lingueglia E, Lazdunski M (2015) Acid-Sensing Ion Channels in the nervous system. Foreword. *Neuropharmacology* 94: 1

Liu Y, Lubin ML, Reitz TL, Wang Y, Colburn RW, Flores CM, Qin N (2006) Molecular identification and functional characterization of a temperature-sensitive transient receptor potential channel (TRPM8) from canine. *Eur J Pharmacol* 530: 23-32

Lloyd G (1975) Alcmaeon and the early history of dissection. *Sudhoffs Arch* 59: 113-47

Loken LS, Wessberg J, Morrison I, McGlone F, Olausson H (2009) Coding of pleasant touch by unmyelinated afferents in humans. *Nat Neurosci* 12: 547-8

Lolignier S, Bonnet C, Gaudio C, Noel J, Ruel J, Amsalem M, Ferrier J, Rodat-Despoix L, Bouvier V, Aissouni Y, Prival L, Chapuy E, Padilla F, Eschalier A, Delmas P, Busserolles J (2015) The Nav1.9 channel is a key determinant of cold pain sensation and cold allodynia. *Cell Rep* 11: 1067-78

Lopshire JC, Nicol GD (1998) The cAMP transduction cascade mediates the prostaglandin E₂ enhancement of the capsaicin-elicited current in rat sensory neurons: whole-cell and single-channel studies. *J Neurosci* 18: 6081-92

Ludwig MG, Vanek M, Guerini D, Gasser JA, Jones CE, Junker U, Hofstetter H, Wolf RM, Seuwen K (2003) Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature* 425: 93-8

Lumpkin EA, Caterina MJ (2007) Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature* 445: 858-65

Lynagh T, Flood E, Boiteux C, Wulf M, Komnatny VV, Colding JM, Allen TW, Pless SA (2017) A selectivity filter at the intracellular end of the acid-sensing ion channel pore. *Elife* 6

Mackenzie RA, Burke D, Skuse NF, Lethlean AK (1975) Fibre function and perception during cutaneous nerve block. *Proc Aust Assoc Neurol* 12: 65-73

Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M, Honore E (1999) Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *J Biol Chem* 274: 26691-6

Maingret F, Lauritzen I, Patel AJ, Heurteaux C, Reyes R, Lesage F, Lazdunski M, Honore E (2000a) TREK-1 is a heat-activated background K(+) channel. *EMBO J* 19: 2483-91

Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M, Honore E (2000b) Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *J Biol Chem* 275: 10128-33

Maizels M, McCarberg B (2005) Antidepressants and antiepileptic drugs for chronic non-cancer pain. *Am Fam Physician* 71: 483-90

Malin SA, Davis BM, Koerber HR, Reynolds IJ, Albers KM, Molliver DC (2008) Thermal nociception and TRPV1 function are attenuated in mice lacking the nucleotide receptor P2Y2. *Pain* 138: 484-96

Mallet C, Daulhac L, Bonnefont J, Ledent C, Etienne M, Chapuy E, Libert F, Eschalier A (2008) Endocannabinoid and serotonergic systems are needed for acetaminophen-induced analgesia. *Pain* 139: 190-200

Mamet J, Baron A, Lazdunski M, Voilley N (2002) Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acid-sensing ion channels. *J Neurosci* 22: 10662-70

Manning DC, Raja SN, Meyer RA, Campbell JN (1991) Pain and hyperalgesia after intradermal injection of bradykinin in humans. *Clin Pharmacol Ther* 50: 721-9

Mansour A, Fox CA, Akil H, Watson SJ (1995) Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci* 18: 22-9

Mantyh PW, Clohisy DR, Koltzenburg M, Hunt SP (2002) Molecular mechanisms of cancer pain. *Nat Rev Cancer* 2: 201-9

Manzano GM, Giuliano LM, Nobrega JA (2008) A brief historical note on the classification of nerve fibers. *Arq Neuropsiquiatr* 66: 117-9

Marotta DM, Costa R, Motta EM, Fernandes ES, Medeiros R, Quintao NL, Campos MM, Calixto JB (2009) Mechanisms underlying the nociceptive responses induced by platelet-activating factor (PAF) in the rat paw. *Biochem Pharmacol* 77: 1223-35

Marra S, Ferru-Clement R, Breuil V, Delaunay A, Christin M, Friend V, Sebille S, Cognard C, Ferreira T, Roux C, Euler-Ziegler L, Noel J, Lingueglia E, Deval E (2016) Non-acidic activation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 3 by lipids. *EMBO J* 35: 414-28

Martin HA, Basbaum AI, Goetzl EJ, Levine JD (1988) Leukotriene B₄ decreases the mechanical and thermal thresholds of C-fiber nociceptors in the hairy skin of the rat. *J Neurophysiol* 60: 438-45

Maruhashi J, Mizuguchi K, Tasaki I (1952) Action currents in single afferent nerve fibres elicited by stimulation of the skin of the toad and the cat. *J Physiol* 117: 129-51

Max MB, Culnane M, Schafer SC, Gracely RH, Walther DJ, Smoller B, Dubner R (1987) Amitriptyline relieves diabetic neuropathy pain in patients with normal or depressed mood. *Neurology* 37: 589-96

Mazzuca M, Heurteaux C, Alloui A, Diochot S, Baron A, Voilley N, Blondeau N, Escoubas P, Gelot A, Cupo A, Zimmer A, Zimmer AM, Eschalier A, Lazdunski M (2007) A tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms. *Nat Neurosci* 10: 943-5

McDougall JJ (2006) Arthritis and pain. Neurogenic origin of joint pain. *Arthritis Res Ther* 8: 220

McKemy DD, Neuhauser WM, Julius D (2002) Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416: 52-8

McKemy DD (2013) The molecular and cellular basis of cold sensation. *ACS Chem Neurosci* 4: 238-47

McMahon SB, Cafferty WB, Marchand F (2005) Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Exp Neurol* 192: 444-62

McMahon SB, Bennett DLH, Bevan S (2006) Inflammatory mediators and modulators of pain. In: McMahon SB, Koltzenburg M, editors *Wall and Melzack's Textbook of Pain* London: Elsevier; 2006 pp 49-72

Mense S (2008) Muscle pain: mechanisms and clinical significance. *Dtsch Arztebl Int* 105: 214-9

Messlinger K (1996) Functional morphology of nociceptive and other fine sensory endings (free nerve endings) in different tissues. *Prog Brain Res* 113: 273-98

Meyer RA, Ringkamp M, Campbell JN, Raja SN (2006) Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In: McMahon SB, Koltzenburg M, editors *Wall and Melzack's Textbook of Pain* London: Elsevier; 2006 pp 3-34

- Mick G, Perrot S, Poulain P, Serrie A, Eschalier A, Langley P, Pomerantz D, Ganry H (2013) Social burden of pain in France: An epidemiological survey National Health and Wellness Survey in 15,000 adults. *Douleurs Evaluation - Diagnostic - Traitement*
- Mickle AD, Shepherd AJ, Mohapatra DP (2015) Sensory TRP channels: the key transducers of nociception and pain. *Prog Mol Biol Transl Sci* 131: 73-118
- Mico JA, Ardid D, Berrocoso E, Eschalier A (2006) Antidepressants and pain. *Trends Pharmacol Sci* 27: 348-54
- Millan MJ (1999) The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57: 1-164
- Miyamoto T, Dubin AE, Petrus MJ, Patapoutian A (2009) TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. *PLoS One* 4: e7596
- Miyamoto T, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A (2011) TRPV3 regulates nitric oxide synthase-independent nitric oxide synthesis in the skin. *Nat Commun* 2: 369
- Mizumura K, Minagawa M, Koda H, Kumazawa T (1995) Influence of histamine on the bradykinin response of canine testicular polymodal receptors in vitro. *Inflamm Res* 44: 376-8
- Moayed M, Davis KD (2013) Theories of pain: from specificity to gate control. *J Neurophysiol* 109: 5-12
- Mogil JS (2009) Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci* 10: 283-94
- Molliver DC, Immke DC, Fierro L, Pare M, Rice FL, McCleskey EW (2005) ASIC3, an acid-sensing ion channel, is expressed in metaboreceptive sensory neurons. *Mol Pain* 1: 35
- Moparthy L, Kichko TI, Eberhardt M, Hogestatt ED, Kjellbom P, Johanson U, Reeh PW, Leffler A, Filipovic MR, Zygmunt PM (2016) Human TRPA1 is a heat sensor displaying intrinsic U-shaped thermosensitivity. *Sci Rep* 6: 28763
- Moqrich A, Hwang SW, Earley TJ, Petrus MJ, Murray AN, Spencer KS, Andahazy M, Story GM, Patapoutian A (2005) Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* 307: 1468-72
- Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Iida T, Segi E, Sugimoto Y, Tominaga T, Narumiya S, Tominaga M (2005) Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Mol Pain* 1: 3
- Motter AL, Ahern GP (2012) TRPA1 is a polyunsaturated fatty acid sensor in mammals. *PLoS One* 7: e38439
- Munns C, AlQatari M, Koltzenburg M (2007) Many cold sensitive peripheral neurons of the mouse do not express TRPM8 or TRPA1. *Cell Calcium* 41: 331-42

Murakami M, Taketomi Y, Miki Y, Sato H, Hirabayashi T, Yamamoto K (2011) Recent progress in phospholipase A(2) research: from cells to animals to humans. *Prog Lipid Res* 50: 152-92

Murray A, Hagen NA (2005) Hydromorphone. *J Pain Symptom Manage* 29: S57-66

Nakamura A, Fujita M, Shiomi H (1996) Involvement of endogenous nitric oxide in the mechanism of bradykinin-induced peripheral hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 117: 407-412

Narumiya S, FitzGerald GA (2001) Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J Clin Invest* 108: 25-30

Neelands TR, Zhang XF, McDonald H, Puttfarcken P (2010) Differential effects of temperature on acid-activated currents mediated by TRPV1 and ASIC channels in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* 1329: 55-66

Newton RA (1982) Joint receptor contributions to reflexive and kinesthetic responses. *Phys Ther* 62: 22-9

Nicol GD, Vasko MR, Evans AR (1997) Prostaglandins suppress an outward potassium current in embryonic rat sensory neurons. *J Neurophysiol* 77: 167-76

Nieto-Posadas A, Picazo-Juarez G, Llorente I, Jara-Oseguera A, Morales-Lazaro S, Escalante-Alcalde D, Islas LD, Rosenbaum T (2012) Lysophosphatidic acid directly activates TRPV1 through a C-terminal binding site. *Nat Chem Biol* 8: 78-85

Noel J, Zimmermann K, Busserolles J, Deval E, Alloui A, Diochot S, Guy N, Borsotto M, Reeh P, Eschali r A, Lazdunski M (2009) The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J* 28: 1308-18

Obata H, Saito S, Ishizaki K, Goto F (2000) Antinociception in rat by sarpogrelate, a selective 5-HT(2A) receptor antagonist, is peripheral. *Eur J Pharmacol* 404: 95-102

Ohtsuki M, Taketomi Y, Arata S, Masuda S, Ishikawa Y, Ishii T, Takanezawa Y, Aoki J, Arai H, Yamamoto K, Kudo I, Murakami M (2006) Transgenic expression of group V, but not group X, secreted phospholipase A2 in mice leads to neonatal lethality because of lung dysfunction. *J Biol Chem* 281: 36420-33

Olesen AE, Andresen T, Staahl C, Drewes AM (2012) Human experimental pain models for assessing the therapeutic efficacy of analgesic drugs. *Pharmacol Rev* 64: 722-79

Olson TH, Riedl MS, Vulchanova L, Ortiz-Gonzalez XR, Elde R (1998) An acid sensing ion channel (ASIC) localizes to small primary afferent neurons in rats. *Neuroreport* 9: 1109-13

Osmakov DI, Kozlov SA, Andreev YA, Koshelev SG, Sanamyan NP, Sanamyan KE, Dyachenko IA, Bondarenko DA, Murashev AN, Mineev KS, Arseniev AS, Grishin EV (2013) Sea anemone peptide with uncommon beta-hairpin structure inhibits acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) and reveals analgesic activity. *J Biol Chem* 288: 23116-27

Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F (2010) Central modulation of pain. *J Clin Invest* 120: 3779-87

Ottani A, Leone S, Sandrini M, Ferrari A, Bertolini A (2006) The analgesic activity of paracetamol is prevented by the blockade of cannabinoid CB₁ receptors. *Eur J Pharmacol* 531: 280-1

Ouellet M, Percival MD (2001) Mechanism of acetaminophen inhibition of cyclooxygenase isoforms. *Arch Biochem Biophys* 387: 273-80

Page AJ, Brierley SM, Martin CM, Martinez-Salgado C, Wemmie JA, Brennan TJ, Symonds E, Omari T, Lewin GR, Welsh MJ, Blackshaw LA (2004) The ion channel ASIC1 contributes to visceral but not cutaneous mechanoreceptor function. *Gastroenterology* 127: 1739-47

Page AJ, Brierley SM, Martin CM, Price MP, Symonds E, Butler R, Wemmie JA, Blackshaw LA (2005) Different contributions of ASIC channels 1a, 2, and 3 in gastrointestinal mechanosensory function. *Gut* 54: 1408-15

Page AJ, Brierley SM, Martin CM, Hughes PA, Blackshaw LA (2007) Acid sensing ion channels 2 and 3 are required for inhibition of visceral nociceptors by benzamil. *Pain* 133: 150-60

Pan HL, Longhurst JC, Eisenach JC, Chen SR (1999) Role of protons in activation of cardiac sympathetic C-fibre afferents during ischaemia in cats. *J Physiol* 518 (Pt 3): 857-66

Park U, Vastani N, Guan Y, Raja SN, Koltzenburg M, Caterina MJ (2011) TRP vanilloid 2 knock-out mice are susceptible to perinatal lethality but display normal thermal and mechanical nociception. *J Neurosci* 31: 11425-36

Patel AJ, Honore E, Maingret F, Lesage F, Fink M, Duprat F, Lazdunski M (1998) A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *EMBO J* 17: 4283-90

Patel AJ, Lazdunski M, Honore E (2001) Lipid and mechano-gated 2P domain K(+) channels. *Curr Opin Cell Biol* 13: 422-8

Paukert M, Babini E, Pusch M, Grunder S (2004) Identification of the Ca²⁺ blocking site of acid-sensing ion channel (ASIC) 1: implications for channel gating. *J Gen Physiol* 124: 383-94

Paukert M, Chen X, Polleleichtner G, Schindelin H, Grunder S (2008) Candidate amino acids involved in H⁺ gating of acid-sensing ion channel 1a. *J Biol Chem* 283: 572-81

Pearson K, Gordon J (2013) Spinal Reflexes. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ, editors Principles of Neural Science 5th ed New York: McGraw-Hill Medical, 2013

Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A (2002) A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108: 705-15

Peigneur S, Beress L, Moller C, Mari F, Forssmann WG, Tytgat J (2012) A natural point mutation changes both target selectivity and mechanism of action of sea anemone toxins. *FASEB J* 26: 5141-51

Pelissier T, Alloui A, Caussade F, Dubray C, Cloarec A, Lavarenne J, Eschalier A (1996) Paracetamol exerts a spinal antinociceptive effect involving an indirect interaction with 5-hydroxytryptamine₃ receptors: in vivo and in vitro evidence. *J Pharmacol Exp Ther* 278: 8-14

Pereira V, Busserolles J, Christin M, Devilliers M, Poupon L, Legha W, Alloui A, Aissouni Y, Bourinet E, Lesage F, Eschalier A, Lazdunski M, Noel J (2014) Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception. *Pain* 155: 2534-44

Perl ER (1996) Cutaneous polymodal receptors: characteristics and plasticity. *Prog Brain Res* 113: 21-37

Perl ER (2007) Ideas about pain, a historical view. *Nat Rev Neurosci* 8: 71-80

Perl ER (2011) Pain mechanisms: a commentary on concepts and issues. *Prog Neurobiol* 94: 20-38

Pert CB, Snyder SH (1973) Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* 179: 1011-4

Petho G, Reeh PW (2012) Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. *Physiol Rev* 92: 1699-775

Petty BG, Cornblath DR, Adornato BT, Chaudhry V, Flexner C, Wachsman M, Sinicropi D, Burton LE, Peroutka SJ (1994) The effect of systemically administered recombinant human nerve growth factor in healthy human subjects. *Ann Neurol* 36: 244-6

Pickering G, Esteve V, Lorient MA, Eschalier A, Dubray C (2008) Acetaminophen reinforces descending inhibitory pain pathways. *Clin Pharmacol Ther* 84: 47-51

Piletta P, Porchet HC, Dayer P (1991) Central analgesic effect of acetaminophen but not of aspirin. *Clin Pharmacol Ther* 49: 350-4

Pini LA, Sandrini M, Vitale G (1996) The antinociceptive action of paracetamol is associated with changes in the serotonergic system in the rat brain. *Eur J Pharmacol* 308: 31-40

- Pinto-Ribeiro F, Moreira V, Pego JM, Leao P, Almeida A, Sousa N (2009) Antinociception induced by chronic glucocorticoid treatment is correlated to local modulation of spinal neurotransmitter content. *Mol Pain* 5: 41
- Pniewska E, Sokolowska M, Kuprys-Lipinska I, Przybek M, Kuna P, Pawliczak R (2014) The step further to understand the role of cytosolic phospholipase A2 alpha and group X secretory phospholipase A2 in allergic inflammation: pilot study. *Biomed Res Int* 2014: 670814
- Poirot O, Berta T, Decosterd I, Kellenberger S (2006) Distinct ASIC currents are expressed in rat putative nociceptors and are modulated by nerve injury. *J Physiol* 576: 215-34
- Poubelle PE, Gingras D, Demers C, Dubois C, Harbour D, Grassi J, Rola-Pleszczynski M (1991) Platelet-activating factor (PAF-acether) enhances the concomitant production of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 by subsets of human monocytes. *Immunology* 72: 181-7
- Poulsen L, Arendt-Nielsen L, Brosen K, Nielsen KK, Gram LF, Sindrup SH (1995) The hypoalgesic effect of imipramine in different human experimental pain models. *Pain* 60: 287-93
- Price DD, Dubner R (1977) Mechanisms of first and second pain in the peripheral and central nervous systems. *J Invest Dermatol* 69: 167-71
- Price MP, Snyder PM, Welsh MJ (1996) Cloning and expression of a novel human brain Na⁺ channel. *J Biol Chem* 271: 7879-82
- Price MP, Lewin GR, McIlwrath SL, Cheng C, Xie J, Heppenstall PA, Stucky CL, Mannsfeldt AG, Brennan TJ, Drummond HA, Qiao J, Benson CJ, Tarr DE, Hrstka RF, Yang B, Williamson RA, Welsh MJ (2000) The mammalian sodium channel BNC1 is required for normal touch sensation. *Nature* 407: 1007-11
- Price MP, McIlwrath SL, Xie J, Cheng C, Qiao J, Tarr DE, Sluka KA, Brennan TJ, Lewin GR, Welsh MJ (2001) The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. *Neuron* 32: 1071-83
- Price MP, Thompson RJ, Eshcol JO, Wemmie JA, Benson CJ (2004) Stomatin modulates gating of acid-sensing ion channels. *J Biol Chem* 279: 53886-91
- Punna-Moorthy A (1987) Evaluation of pH changes in inflammation of the subcutaneous air pouch lining in the rat, induced by carrageenan, dextran and *Staphylococcus aureus*. *J Oral Pathol* 16: 36-44
- Qadri YJ, Berdiev BK, Song Y, Lipton HL, Fuller CM, Benos DJ (2009) Psalmotoxin-1 docking to human acid-sensing ion channel-1. *J Biol Chem* 284: 17625-33
- Qiu F, Qiu CY, Liu YQ, Wu D, Li JD, Hu WP (2012) Potentiation of acid-sensing ion channel activity by the activation of 5-HT(2) receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuropharmacology* 63: 494-500

- Rackham A, Ford-Hutchinson AW (1983) Inflammation and pain sensitivity: effects of leukotrienes D₄, B₄ and prostaglandin E₁ in the rat paw. *Prostaglandins* 25: 193-203
- Raffa RB, Friderichs E, Reimann W, Shank RP, Codd EE, Vaught JL (1992) Opioid and nonopioid components independently contribute to the mechanism of action of tramadol, an 'atypical' opioid analgesic. *J Pharmacol Exp Ther* 260: 275-85
- Rahman T, Smith ES (2014) In silico assessment of interaction of sea anemone toxin APETx2 and acid sensing ion channel 3. *Biochem Biophys Res Commun* 450: 384-9
- Raja SN, Meyer RA, Campbell JN (1988) Peripheral mechanisms of somatic pain. *Anesthesiology* 68: 571-90
- Ramaswamy SS, MacLean DM, Gorfe AA, Jayaraman V (2013) Proton-mediated conformational changes in an acid-sensing ion channel. *J Biol Chem* 288: 35896-903
- Rao P, Knaus EE (2008) Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J Pharm Pharm Sci* 11: 81s-110s
- Raouf R, Quick K, Wood JN (2010) Pain as a channelopathy. *J Clin Invest* 120: 3745-52
- Renback K, Inoue M, Ueda H (1999) Lysophosphatidic acid-induced, pertussis toxin-sensitive nociception through a substance P release from peripheral nerve endings in mice. *Neurosci Lett* 270: 59-61
- Renback K, Inoue M, Yoshida A, Nyberg F, Ueda H (2000) Vzg-1/lysophosphatidic acid-receptor involved in peripheral pain transmission. *Brain Res Mol Brain Res* 75: 350-4
- Reznikov LR, Meyerholz DK, Adam RJ, Abou Alaiwa M, Jaffer O, Michalski AS, Powers LS, Price MP, Stoltz DA, Welsh MJ (2016) Acid-Sensing Ion Channel 1a Contributes to Airway Hyperreactivity in Mice. *PLoS One* 11: e0166089
- Ribau C, Duchange N (2003) Éléments pour une histoire des conceptions de la douleur.
- Ricciotti E, FitzGerald GA (2011) Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 986-1000
- Robinson DR, Gebhart GF (2008) Inside information: the unique features of visceral sensation. *Mol Interv* 8: 242-53
- Rodriguez AA, Salceda E, Garateix AG, Zaharenko AJ, Peigneur S, Lopez O, Pons T, Richardson M, Diaz M, Hernandez Y, Standker L, Tytgat J, Soto E (2014) A novel sea anemone peptide that inhibits acid-sensing ion channels. *Peptides* 53: 3-12
- Roy S, Boiteux C, Alijevic O, Liang C, Berneche S, Kellenberger S (2013) Molecular determinants of desensitization in an ENaC/degenerin channel. *FASEB J* 27: 5034-45

Roza C, Puel JL, Kress M, Baron A, Diochot S, Lazdunski M, Waldmann R (2004) Knockout of the ASIC2 channel in mice does not impair cutaneous mechanosensation, visceral mechanonociception and hearing. *J Physiol* 558: 659-69

Russell MB, Rasmussen BK, Fenger K, Olesen J (1996) Migraine without aura and migraine with aura are distinct clinical entities: a study of four hundred and eighty-four male and female migraineurs from the general population. *Cephalalgia* 16: 239-45

Sabatowski R, Schafer D, Kasper SM, Brunsch H, Radbruch L (2004) Pain treatment: a historical overview. *Curr Pharm Des* 10: 701-16

Salinas M, Rash LD, Baron A, Lambeau G, Escoubas P, Lazdunski M (2006) The receptor site of the spider toxin PcTx1 on the proton-gated cation channel ASIC1a. *J Physiol* 570: 339-54

Salinas M, Lazdunski M, Lingueglia E (2009) Structural elements for the generation of sustained currents by the acid pain sensor ASIC3. *J Biol Chem* 284: 31851-9

Salinas M, Besson T, Delettre Q, Diochot S, Boulakirba S, Douguet D, Lingueglia E (2014) Binding site and inhibitory mechanism of the mambalgins-2 pain-relieving peptide on acid-sensing ion channel 1a. *J Biol Chem* 289: 13363-73

Sandoz G, Douguet D, Chatelain F, Lazdunski M, Lesage F (2009) Extracellular acidification exerts opposite actions on TREK1 and TREK2 potassium channels via a single conserved histidine residue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 14628-33

Sasaki M, Obata H, Kawahara K, Saito S, Goto F (2006) Peripheral 5-HT_{2A} receptor antagonism attenuates primary thermal hyperalgesia and secondary mechanical allodynia after thermal injury in rats. *Pain* 122: 130-6

Saugstad JA, Roberts JA, Dong J, Zeitouni S, Evans RJ (2004) Analysis of the membrane topology of the acid-sensing ion channel 2a. *J Biol Chem* 279: 55514-9

Sawynok J, Esser MJ, Reid AR (2001) Antidepressants as analgesics: an overview of central and peripheral mechanisms of action. *J Psychiatry Neurosci* 26: 21-9

Schaible HG, Grubb BD (1993) Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain* 55: 5-54

Schepers RJ, Ringkamp M (2009) Thermoreceptors and thermosensitive afferents. *Neurosci Biobehav Rev* 33: 205-12

Schild L, Schneeberger E, Gautschi I, Firsov D (1997) Identification of amino acid residues in the alpha, beta, and gamma subunits of the epithelial sodium channel (ENaC) involved in amiloride block and ion permeation. *J Gen Physiol* 109: 15-26

Schmelz M, Osiander G, Blunk J, Ringkamp M, Reeh PW, Handwerker HO (1997) Intracutaneous injections of platelets cause acute pain and protracted hyperalgesia. *Neurosci Lett* 226: 171-4

- Schmidt R, Schmelz M, Forster C, Ringkamp M, Torebjork E, Handwerker H (1995) Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci* 15: 333-41
- Schnizler MK, Schnizler K, Zha XM, Hall DD, Wemmie JA, Hell JW, Welsh MJ (2009) The cytoskeletal protein alpha-actinin regulates acid-sensing ion channel 1a through a C-terminal interaction. *J Biol Chem* 284: 2697-705
- Schwartz L, Guais A, Pooya M, Abolhassani M (2009) Is inflammation a consequence of extracellular hyperosmolarity? *J Inflamm (Lond)* 6: 21
- Sengupta JN, Saha JK, Goyal RK (1990) Stimulus-response function studies of esophageal mechanosensitive nociceptors in sympathetic afferents of opossum. *J Neurophysiol* 64: 796-812
- Sengupta JN, Saha JK, Goyal RK (1992) Differential sensitivity to bradykinin of esophageal distension-sensitive mechanoreceptors in vagal and sympathetic afferents of the opossum. *J Neurophysiol* 68: 1053-67
- Sherwood TW, Askwith CC (2008) Endogenous arginine-phenylalanine-amide-related peptides alter steady-state desensitization of ASIC1a. *J Biol Chem* 283: 1818-30
- Sherwood T, Franke R, Conneely S, Joyner J, Arumugan P, Askwith C (2009) Identification of protein domains that control proton and calcium sensitivity of ASIC1a. *J Biol Chem* 284: 27899-907
- Sherwood TW, Askwith CC (2009) Dynorphin opioid peptides enhance acid-sensing ion channel 1a activity and acidosis-induced neuronal death. *J Neurosci* 29: 14371-80
- Sherwood TW, Lee KG, Gormley MG, Askwith CC (2011) Heteromeric acid-sensing ion channels (ASICs) composed of ASIC2b and ASIC1a display novel channel properties and contribute to acidosis-induced neuronal death. *J Neurosci* 31: 9723-34
- Sherwood TW, Frey EN, Askwith CC (2012) Structure and activity of the acid-sensing ion channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 303: C699-710
- Sidman RL (1971) High resolution mouse brain atlas. Atlas of the mouse brain and spinal cord
- Simone DA, Kajander KC (1997) Responses of cutaneous A-fiber nociceptors to noxious cold. *J Neurophysiol* 77: 2049-60
- Sindrup SH, Brosen K, Bjerring P, Arendt-Nielsen L, Larsen U, Angelo HR, Gram LF (1990) Codeine increases pain thresholds to copper vapor laser stimuli in extensive but not poor metabolizers of sparteine. *Clin Pharmacol Ther* 48: 686-93
- Slater D, Kunnathil S, McBride J, Koppala R (2010) Pharmacology of nonsteroidal antiinflammatory drugs and opioids. *Semin Intervent Radiol* 27: 400-11
- Sluka KA, Kalra A, Moore SA (2001) Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. *Muscle Nerve* 24: 37-46

Sluka KA, Price MP, Breese NM, Stucky CL, Wemmie JA, Welsh MJ (2003) Chronic hyperalgesia induced by repeated acid injections in muscle is abolished by the loss of ASIC3, but not ASIC1. *Pain* 106: 229-39

Sluka KA, Radhakrishnan R, Benson CJ, Eshcol JO, Price MP, Babinski K, Audette KM, Yeomans DC, Wilson SP (2007) ASIC3 in muscle mediates mechanical, but not heat, hyperalgesia associated with muscle inflammation. *Pain* 129: 102-12

Smith ES, Cadiou H, McNaughton PA (2007) Arachidonic acid potentiates acid-sensing ion channels in rat sensory neurons by a direct action. *Neuroscience* 145: 686-98

Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, Wright JE, Jerman JC, Walhin JP, Ooi L, Egerton J, Charles KJ, Smart D, Randall AD, Anand P, Davis JB (2002) TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* 418: 186-90

Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 271: 33157-60

Souslova V, Cesare P, Ding Y, Akopian AN, Stanfa L, Suzuki R, Carpenter K, Dickenson A, Boyce S, Hill R, Nebunius-Oosthuizen D, Smith AJ, Kidd EJ, Wood JN (2000) Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X3 receptors. *Nature* 407: 1015-7

Spooner JB, Harvey JG (1976) The history and usage of paracetamol. *J Int Med Res* 4: 1-6

Springauf A, Bresenitz P, Grunder S (2011) The interaction between two extracellular linker regions controls sustained opening of acid-sensing ion channel 1. *J Biol Chem* 286: 24374-84

Stanley TH (2014) The fentanyl story. *J Pain* 15: 1215-26

Staruschenko A, Dorofeeva NA, Bolshakov KV, Stockand JD (2007) Subunit-dependent cadmium and nickel inhibition of acid-sensing ion channels. *Dev Neurobiol* 67: 97-107

Steen KH, Reeh PW (1993) Sustained graded pain and hyperalgesia from harmless experimental tissue acidosis in human skin. *Neurosci Lett* 154: 113-6

Steen KH, Steen AE, Reeh PW (1995) A dominant role of acid pH in inflammatory excitation and sensitization of nociceptors in rat skin, in vitro. *J Neurosci* 15: 3982-9

Steen KH, Steen AE, Kreysel HW, Reeh PW (1996) Inflammatory mediators potentiate pain induced by experimental tissue acidosis. *Pain* 66: 163-70

Stein C, Schafer M, Machelska H (2003) Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nat Med* 9: 1003-8

Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A (2003) ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112: 819-29

Sufka KJ, Schomburg FM, Giordano J (1992) Receptor mediation of 5-HT-induced inflammation and nociception in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 41: 53-6

Sugimura N, Ikeuchi M, Izumi M, Kawano T, Aso K, Kato T, Ushida T, Yokoyama M, Tani T (2015) Repeated intra-articular injections of acidic saline produce long-lasting joint pain and widespread hyperalgesia. *Eur J Pain* 19: 629-38

Sugiura T, Dang K, Lamb K, Bielefeldt K, Gebhart GF (2005) Acid-sensing properties in rat gastric sensory neurons from normal and ulcerated stomach. *J Neurosci* 25: 2617-27

Sutherland SP, Benson CJ, Adelman JP, McCleskey EW (2001) Acid-sensing ion channel 3 matches the acid-gated current in cardiac ischemia-sensing neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 711-6

Svennerholm L (1968) Distribution and fatty acid composition of phosphoglycerides in normal human brain. *J Lipid Res* 9: 570-9

Tajfel P, Gerche S, Huas D (2002) La douleur en médecine générale. *Douleur et Analgésie*

Talavera K, Yasumatsu K, Voets T, Droogmans G, Shigemura N, Ninomiya Y, Margolskee RF, Nilius B (2005) Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature* 438: 1022-5

Tan CH, McNaughton PA (2016) The TRPM2 ion channel is required for sensitivity to warmth. *Nature* 536: 460-3

Taylor-Clark TE, Undem BJ, Macglashan DW, Jr., Ghatta S, Carr MJ, McAlexander MA (2008) Prostaglandin-induced activation of nociceptive neurons via direct interaction with transient receptor potential A1 (TRPA1). *Mol Pharmacol* 73: 274-81

Taylor-Clark TE, Ghatta S, Bettner W, Undem BJ (2009) Nitrooleic acid, an endogenous product of nitrative stress, activates nociceptive sensory nerves via the direct activation of TRPA1. *Mol Pharmacol* 75: 820-9

Thut PD, Wrigley D, Gold MS (2003) Cold transduction in rat trigeminal ganglia neurons in vitro. *Neuroscience* 119: 1071-83

Tillman DB, Treede RD, Meyer RA, Campbell JN (1995) Response of C fibre nociceptors in the anaesthetized monkey to heat stimuli: estimates of receptor depth and threshold. *J Physiol* 485 (Pt 3): 753-65

Tjolsen A, Lund A, Hole K (1991) Antinociceptive effect of paracetamol in rats is partly dependent on spinal serotonergic systems. *Eur J Pharmacol* 193: 193-201

- Togashi K, Hara Y, Tominaga T, Higashi T, Konishi Y, Mori Y, Tominaga M (2006) TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO J* 25: 1804-15
- Tokunaga A, Saika M, Senba E (1998) 5-HT_{2A} receptor subtype is involved in the thermal hyperalgesic mechanism of serotonin in the periphery. *Pain* 76: 349-55
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21: 531-43
- Treede RD, Meyer RA, Raja SN, Campbell JN (1995) Evidence for two different heat transduction mechanisms in nociceptive primary afferents innervating monkey skin. *J Physiol* 483 (Pt 3): 747-58
- Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H (2008) Opioid pharmacology. *Pain Physician* 11: S133-53
- Trevisani M, Siemens J, Materazzi S, Bautista DM, Nassini R, Campi B, Imamachi N, Andre E, Patacchini R, Cottrell GS, Gatti R, Basbaum AI, Bunnett NW, Julius D, Geppetti P (2007) 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 13519-24
- Tsuda M, Inoue K (2006) P2X Receptors in Sensory Neurons. *Current Topics in Membrane* 57: 277-310
- Tura B, Tura SM (1990) The analgesic effect of tricyclic antidepressants. *Brain Res* 518: 19-22
- Uchida H, Nagai J, Ueda H (2014) Lysophosphatidic acid and its receptors LPA1 and LPA3 mediate paclitaxel-induced neuropathic pain in mice. *Mol Pain* 10: 71
- Ueda H (2008) Peripheral mechanisms of neuropathic pain - involvement of lysophosphatidic acid receptor-mediated demyelination. *Mol Pain* 4: 11
- Ugawa S, Ueda T, Ishida Y, Nishigaki M, Shibata Y, Shimada S (2002) Amiloride-blockable acid-sensing ion channels are leading acid sensors expressed in human nociceptors. *J Clin Invest* 110: 1185-90
- van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 112-24
- Vane JR (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 231: 232-5
- Vane JR, Botting RM (1998) Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 104: 2S-8S; discussion 21S-22S
- Vilim FS, Aarnisalo AA, Nieminen ML, Lintunen M, Karlstedt K, Kontinen VK, Kalso E, States B, Panula P, Ziff E (1999) Gene for pain modulatory neuropeptide NPFF: induction in spinal cord by noxious stimuli. *Mol Pharmacol* 55: 804-11

Voilley N, de Weille J, Mamet J, Lazdunski M (2001) Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. *J Neurosci* 21: 8026-33

Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, Lozano R, Michaud C, Ezzati M, Shibuya K, Salomon JA, Abdalla S, Aboyans V, Abraham J, Ackerman I, Aggarwal R, Ahn SY, Ali MK, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C et al. (2012) Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380: 2163-96

Vriens J, Owsianik G, Hofmann T, Philipp SE, Stab J, Chen X, Benoit M, Xue F, Janssens A, Kerselaers S, Oberwinkler J, Vennekens R, Gudermann T, Nilius B, Voets T (2011) TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron* 70: 482-94

Vriens J, Nilius B, Voets T (2014) Peripheral thermosensation in mammals. *Nat Rev Neurosci* 15: 573-89

Vyvey M (2010) Steroids as pain relief adjuvants. *Can Fam Physician* 56: 1295-7, e415

Walder RY, Rasmussen LA, Rainier JD, Light AR, Wemmie JA, Sluka KA (2010) ASIC1 and ASIC3 play different roles in the development of Hyperalgesia after inflammatory muscle injury. *J Pain* 11: 210-8

Waldmann R, Champigny G, Voilley N, Lauritzen I, Lazdunski M (1996) The mammalian degenerin MDEG, an amiloride-sensitive cation channel activated by mutations causing neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 271: 10433-6

Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Heurteaux C, Lazdunski M (1997a) A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* 386: 173-7

Waldmann R, Bassilana F, de Weille J, Champigny G, Heurteaux C, Lazdunski M (1997b) Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na⁺ channel specific for sensory neurons. *J Biol Chem* 272: 20975-8

Waldmann R, Lazdunski M (1998) H(+)-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels. *Curr Opin Neurobiol* 8: 418-24

Waldmann R, Champigny G, Lingueglia E, De Weille JR, Heurteaux C, Lazdunski M (1999) H(+)-gated cation channels. *Ann N Y Acad Sci* 868: 67-76

Wang W, Duan B, Xu H, Xu L, Xu TL (2006) Calcium-permeable acid-sensing ion channel is a molecular target of the neurotoxic metal ion lead. *J Biol Chem* 281: 2497-505

Wang W, Yu Y, Xu TL (2007) Modulation of acid-sensing ion channels by Cu(2+) in cultured hypothalamic neurons of the rat. *Neuroscience* 145: 631-41

Wang X, Li WG, Yu Y, Xiao X, Cheng J, Zeng WZ, Peng Z, Xi Zhu M, Xu TL (2013) Serotonin facilitates peripheral pain sensitivity in a manner that depends on the nonproton ligand sensing domain of ASIC3 channel. *J Neurosci* 33: 4265-79

Warburg O, Posener K, Negelein E (1924) Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Biochemische Zeitschrift* 152: 309-344

Warolin C (1999) [Pierre-Jean Robiquet]. *Rev Hist Pharm (Paris)* 47: 97-110

Watanabe H, Vriens J, Suh SH, Benham CD, Droogmans G, Nilius B (2002) Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem* 277: 47044-51

Wemmie JA, Chen J, Askwith CC, Hruska-Hageman AM, Price MP, Nolan BC, Yoder PG, Lamani E, Hoshi T, Freeman JH, Jr., Welsh MJ (2002) The acid-activated ion channel ASIC contributes to synaptic plasticity, learning, and memory. *Neuron* 34: 463-77

Wemmie JA, Askwith CC, Lamani E, Cassell MD, Freeman JH, Jr., Welsh MJ (2003) Acid-sensing ion channel 1 is localized in brain regions with high synaptic density and contributes to fear conditioning. *J Neurosci* 23: 5496-502

Wetzel C, Hu J, Riethmacher D, Benckendorff A, Harder L, Eilers A, Moshourab R, Kozlenkov A, Labuz D, Caspani O, Erdmann B, Machelska H, Heppenstall PA, Lewin GR (2007) A stomatin-domain protein essential for touch sensation in the mouse. *Nature* 445: 206-9

Wiffen PJ, Derry S, Moore RA, Aldington D, Cole P, Rice AS, Lunn MP, Hamunen K, Haanpaa M, Kalso EA (2013) Antiepileptic drugs for neuropathic pain and fibromyalgia - an overview of Cochrane reviews. *Cochrane Database Syst Rev* 11: CD010567

Wilson SG, Mogil JS (2001) Measuring pain in the (knockout) mouse: big challenges in a small mammal. *Behav Brain Res* 125: 65-73

Wolf S, Hardy JD (1941) Studies on Pain. Observations on Pain Due to Local Cooling and on Factors Involved in the "Cold Pressor" Effect. *J Clin Invest* 20: 521-33

Wu LJ, Duan B, Mei YD, Gao J, Chen JG, Zhuo M, Xu L, Wu M, Xu TL (2004) Characterization of acid-sensing ion channels in dorsal horn neurons of rat spinal cord. *J Biol Chem* 279: 43716-24

Wultsch T, Painsipp E, Shahbazian A, Mitrovic M, Edelsbrunner M, Lazdunski M, Waldmann R, Holzer P (2008) Deletion of the acid-sensing ion channel ASIC3 prevents gastritis-induced acid hyperresponsiveness of the stomach-brainstem axis. *Pain* 134: 245-53

Xie W, Robertson DL, Simmons DL (1992) Mitogen-Inducible Prostaglandin G/H Synthase: A New Target for Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. *Drug Development Research*

- Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, Lawson D, Ge P, Lilly J, Silos-Santiago I, Xie Y, DiStefano PS, Curtis R, Clapham DE (2002) TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* 418: 181-6
- Yagi J, Wenk HN, Naves LA, McCleskey EW (2006) Sustained currents through ASIC3 ion channels at the modest pH changes that occur during myocardial ischemia. *Circ Res* 99: 501-9
- Yan J, Edelmayer RM, Wei X, De Felice M, Porreca F, Dussor G (2011) Dural afferents express acid-sensing ion channels: a role for decreased meningeal pH in migraine headache. *Pain* 152: 106-13
- Yan J, Wei X, Bischoff C, Edelmayer RM, Dussor G (2013) pH-evoked dural afferent signaling is mediated by ASIC3 and is sensitized by mast cell mediators. *Headache* 53: 1250-61
- Yang L, Palmer LG (2014) Ion conduction and selectivity in acid-sensing ion channel 1. *J Gen Physiol* 144: 245-55
- Yermolaieva O, Leonard AS, Schnizler MK, Abboud FM, Welsh MJ (2004) Extracellular acidosis increases neuronal cell calcium by activating acid-sensing ion channel 1a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6752-7
- Yiangou Y, Facer P, Smith JA, Sangameswaran L, Eglen R, Birch R, Knowles C, Williams N, Anand P (2001) Increased acid-sensing ion channel ASIC-3 in inflamed human intestine. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13: 891-6
- Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takuwa Y, Shimizu T (1997) A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. *Nature* 387: 620-4
- Yokomizo T, Kato K, Terawaki K, Izumi T, Shimizu T (2000) A second leukotriene B₄ receptor, BLT2. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *J Exp Med* 192: 421-32
- Yoshida S, Matsuzaki T, Kamijo A, Araki Y, Sakamoto M, Moriyama S, Hosono M (2013) Histopathological changes in the periphery of the sciatic nerve of rats after knee joint immobilization. *J Phys Ther Sci* 25: 623-6
- Yu Y, Chen Z, Li WG, Cao H, Feng EG, Yu F, Liu H, Jiang H, Xu TL (2010) A nonproton ligand sensor in the acid-sensing ion channel. *Neuron* 68: 61-72
- Yu Y, Li WG, Chen Z, Cao H, Yang H, Jiang H, Xu TL (2011) Atomic level characterization of the nonproton ligand-sensing domain of ASIC3 channels. *J Biol Chem* 286: 24996-5006
- Zeitz KP, Guy N, Malmberg AB, Dirajlal S, Martin WJ, Sun L, Bonhaus DW, Stucky CL, Julius D, Basbaum AI (2002) The 5-HT₃ subtype of serotonin receptor contributes to nociceptive processing via a novel subset of myelinated and unmyelinated nociceptors. *J Neurosci* 22: 1010-9

Zha XM, Costa V, Harding AM, Reznikov L, Benson CJ, Welsh MJ (2009) ASIC2 subunits target acid-sensing ion channels to the synapse via an association with PSD-95. *J Neurosci* 29: 8438-46

Zhang JM, An J (2007) Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin* 45: 27-37

Zimmermann K, Leffler A, Babes A, Cendan CM, Carr RW, Kobayashi J, Nau C, Wood JN, Reeh PW (2007) Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. *Nature* 447: 855-8

Zimmermann K, Hein A, Hager U, Kaczmarek JS, Turnquist BP, Clapham DE, Reeh PW (2009) Phenotyping sensory nerve endings in vitro in the mouse. *Nat Protoc* 4: 174-96

Zimmermann K, Lennerz JK, Hein A, Link AS, Kaczmarek JS, Delling M, Uysal S, Pfeifer JD, Riccio A, Clapham DE (2011) Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5 (TRPC5) is a cold-transducer in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 18114-9