UNIVERSITE DE NICE SOPHIA-ANTIPOLIS
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé
Faculté UFR Sciences

THESE

Pour obtenir le titre de

Docteur en Sciences de la Vie

de l'Université de Nice Sophia-Antipolis

Spécialité : Interactions moléculaires et cellulaires

Soutenue et présentée par :

Anne DELAUNAY

ROLES ET REGULATIONS DES CANAUX IONIQUES ASIC3 DANS LA DOULEUR

Thèse dirigée par le Dr Emmanuel DEVAL

Soutenue à l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire,
à Sophia-Antipolis, le mercredi 30 Octobre 2013 à 14h30

Devant le jury composé de :

M. Jacques NOEL	Professeur	Président du Jury
M. Patrick BOIS	Professeur	Rapporteur
M. Patrick Delmas	Docteur	Rapporteur
M. Cyril GOUDET	Docteur	Examinateur
Mme. Catherine HEURTEAUX	Docteur	Examinatrice
M. Emmanuel DEVAL	Docteur	Directeur de Thèse

Thèse effectuée à **l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC)**

Au sein de l'équipe **« Canaux ioniques et douleur »,** dirigée par le **Dr Eric LINGUEGLIA**

Unité mixte de recherche CNRS UNSA (UMR 7275)
660, route des lucioles,
06 560 Valbonne,
Sophia-Antipolis

RESUME

Rôles et régulations des canaux ASIC3 (*« Acid Sensing Ion Channels 3 »*) dans la douleur.

Les douleurs chroniques, d'origine inflammatoire, neuropathique ou incisionnelle, affectent environ 20 % de la population adulte et jusqu'à 50 % de la population âgée. Elles représentent ainsi un véritable enjeu de santé publique. Malgré l'existence de grandes familles d'analgésiques, les traitements restent souvent inefficaces. Cela est dû en grande partie à un manque de connaissances des mécanismes physiopathologiques de la douleur.

Durant ma thèse, je me suis intéressée aux rôles et aux régulations de senseurs moléculaires de la douleur récemment mis en évidence: les canaux ioniques ASIC (« Acid Sensing Ion Channels »). Les ASIC forment une famille de canaux cationiques, excitateurs. Les canaux ASIC3, en particulier, sont présents dans les neurones sensoriels qui innervent la peau, les muscles, les viscères et les articulations. Ils sont activés par de faibles acidifications extracellulaires qui se produisent au cours de nombreux mécanismes physiopathologiques comme l'inflammation, l'ischémie, le développement tumoral, ou encore les lésions tissulaires consécutives, par exemple, à une chirurgie.

Dans une première étude, nous avons montré que les canaux ASIC3 jouent un rôle primordial dans le développement des douleurs post-opératoires, notamment dans les douleurs posturales, proches des cas cliniques. A partir d'un modèle d'incision plantaire chez le rat, nous avons mis en évidence une surexpression des canaux ASIC3 dans les neurones sensoriels qui innervent la patte opérée. L'inhibition pharmacologique (toxine) et génique (siARN) d'ASIC3 *in vivo* réduit le comportement douloureux.

Notre seconde étude a porté sur le canal ASIC3 humain, peu étudié jusqu'ici. J'ai démontré que ce canal possède une propriété originale et inductible qui lui confère une sensibilité, non seulement à l'acidification, mais également à l'alcalinisation extracellulaire. Cette sensibilité alcaline est une caractéristique intrinsèque du canal. Elle implique deux résidus arginine spécifiques à la protéine humaine et présents sur sa boucle extracellulaire. Le canal ASIC3 humain, en adaptant son activité à différents environnements de pH, pourrait ainsi participer à la régulation fine du potentiel de membrane et à la sensibilisation neuronale.

Plus récemment, j'ai étudié la régulation du canal ASIC3 par des lipides inflammatoires et ses conséquences sur la douleur. De manière très intéressante, je démontre que la lysophosphatidylcholine (LPC), un lipide issu de la dégradation membranaire lors de processus inflammatoires, est un nouvel activateur du canal ASIC3 en conditions normales de pH. De plus, en synergie avec une acidose modérée (pH 7,0), la LPC et son analogue non métabolisable produisent une douleur spontanée chez les rats, qui est réduite en présence de toxine inhibitrice d'ASIC3.

Mots clés : ASIC3, douleur, acidification, alcalinisation, lipides inflammatoires, électrophysiologie, comportement animal

A ma Maman, mes Parents,

A ma Famille,

A la mémoire de mon Pépé et ma Mémé.

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier tous ceux qui m'ont encouragé, soutenu et qui m'ont permis d'effectuer ce grand départ vers cette belle région, nouvelle et inconnue. Ce changement d'environnement, d'univers, loin des miens, m'a permis, non sans difficultés, d'évoluer, de rencontrer de nouvelles personnes et de réaliser ces travaux. Cela a donné un nouveau sens à ma vie professionnelle et personnelle.

Merci au Dr Eric LINGUEGLIA, qui m'a offert l'opportunité de travailler au sein de son équipe, tout d'abord en tant que stagiaire, puis comme thésarde. Sans ce fameux « coup de fil », qui un beau jour m'a annoncé que j'étais acceptée en stage dans son laboratoire à l'IPMC à Sophia-Antipolis, tout cela n'aurait pu être possible.

Je remercie le Dr Emmanuel DEVAL, d'avoir dirigé ma thèse. Pour son soutien et ses conseils tout au long de ces années de travail et pour ses critiques qui m'ont largement aidé dans l'élaboration de cet écrit.

Je suis reconnaissante aux membres du Jury, de lire et d'examiner ce travail, le Dr Patrick DELMAS ainsi que le Pr Patrick BOIS, qui m'a enseigné les bases de la physiologie utiles à ce travail. Merci à eux de me faire l'honneur de rapporter ce travail. Merci aux Dr Cyril GOUDET et Catherine HEURTEAUX d'avoir accepté d'examiner ma thèse.

Je remercie particulièrement le Pr Jacques NOEL, qui a accepté de présider ce jury.
Merci pour son soutien sans faille tout au long de mes stages, de mon parcours universitaire et de ma thèse.

Je tiens à remercier également tous les membres de l'équipe pour leur accueil chaleureux à mon arrivée, leur collaboration et leur bonne humeur au labo : Anne BARON, Valérie FRIEND, Sylvie DIOCHOT, Miguel SALINAS et Mélodie.

Sans oublier les étudiants, Marine et Seb. Merci à Marine, d'avoir supporté de partager ma chambre les veilles stressantes de présentations en congrès ! Merci à eux deux pour leurs discussions, critiques, confidences… Pour leur soutien dans les meilleurs et les moins bons moments… Pour leur compréhension et leurs conseils, personnels, professionnels et amicaux lors des choix difficiles de fin de thèse.

Je remercie également tous les membres de l'étage, pour leurs conseils et leur bonne humeur qui a permis un travail dans d'agréables conditions : Gwén, Céline, Anouar, Jen, Carole, Massimo, Stéphane et aussi Sandrine, pour sa gentillesse et ses conseils compréhensifs.

Merci à tous les doctorants, amis et collègues, avec qui j'ai partagé les mêmes joies, peines, passions et galères ! Camille, Julien, et tous les autres…

Un grand merci à ma famille, mes parents, qui ont toujours été là pour me soutenir, m'encourager et me conseiller dans mes choix. Merci immense à ma maman, qui, de près ou de loin, dans les moments de joie et de peine, est toujours présente pour moi…

Enfin, merci à Eric, pour sa présence et son soutien de tous les instants pendant ces années. Merci à lui de m'avoir donné la force, la motivation et d'avoir compris mes choix, sans jugements et sans prise de position…

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS

TABLE DES ILLUSTRATIONS

INTRODUCTION GENERALE **1**

INTRODUCTION **2**

A. La douleur - Les douleurs **2**

1. Définitions et représentations de la douleur dans l'histoire et dans l'art 2
   a. Définitions de la douleur 2
      ✓ La douleur « physiologique » ou nociceptive 2
      ✓ Les douleurs chroniques: douleurs inflammatoires et neuropathiques 2
      ✓ Notion de seuil de perception et de tolérance a la douleur 3
   b. La représentation de la douleur dans l'histoire et dans l'art 4
      ✓ La représentation de la douleur dans l'histoire 4
      ✓ La représentation de la douleur dans l'art 8
2. Physiologie de la douleur 12
   a. La perception au niveau périphérique 12
      ✓ Les nocicepteurs et les fibres afférentes primaires 12
      ✓ Les facteurs d'activation et de sensibilisation des nocicepteurs 16
      ✓ Les acteurs de la propagation du signal nociceptif 30
   b. La transmission du message douloureux jusqu'au cerveau via la moelle épinière 32
3. Traitements de la douleur 38
   a. Les traitements pharmacologiques 38
      ✓ Les antalgiques : le paracétamol, l'aspirine et les anti-inflammatoires non stéroidiens 38
      ✓ Les analgésiques opioïdes : la morphine et ses dérivés 42
      ✓ D'autres molécules au pouvoir analgésique 44
   b. Les traitements non médicamenteux 45
      ✓ L'acupuncture traditionnelle 45
      ✓ L'électrostimulation et l'electro-acupuncture 46
      ✓ L'hypnose 47
      ✓ L'effet placebo 47

B. Les canaux ioniques ASIC **50**

1. Différents canaux ASIC 50
   a. La diversité des canaux ASIC 50
   b. La structure des canaux ASIC 52
   c. Les mécanismes d'ouverture des canaux ASIC 56

2. Propriétés biophysiques des canaux ASIC 57
a. La perméabilité ionique 57
b. Les différents types de courants ASIC 57
3. Distribution tissulaire des ASIC 62
a. Dans le système nerveux 62
✓ Dans le système nerveux périphérique 62
✓ Dans le système nerveux central 63
b. Dans les autres tissus et organes 64
4. Pharmacologie des canaux ASIC 66
a. Les petites molécules 66
✓ L'amiloride et ses dérivés 66
✓ Les ions 66
✓ Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) 68
✓ Le GMQ (guanidine-4-methylquinazoline) et les molécules similaires 68
b. Les neuropeptides de la famille du FMRFamide 69
c. Les peptides d'origine animale 69
✓ La Psalmotoxine 1 69
✓ l'APETx2 70
✓ La MitTx 70
✓ Les Mambalgines 71
✓ L'AnmTX Ugr 9-1 71
5. Rôles des canaux ASIC dans la douleur 72
a. Rôles dans les douleurs périphériques 72
✓ Douleur somatique 72
✓ Douleur viscérale 76
b. Rôles dans la modulation centrale de la douleur 78

CONTEXTE DE L'ETUDE EXPERIMENTALE 80

RESULTATS EXPERIMENTAUX 82

A. Implication du canal ASIC3 dans la douleur post-opératoire chez le rat 83
1. Contexte de l'étude 83
2. Article 87
3. Résumé de l'étude et discussion 96

B. Rôle et régulation du canal ionique ASIC3 humain 98
1. Contexte de l'étude 98
2. Article 99
3. Résumé de l'étude et discussion 106

C. Régulation des canaux ioniques ASIC3 de rat par un lipide provenant de la dégradation membranaire **108**
1. Contexte de l'étude 108
2. Résultats expérimentaux (en vue d'une prochaine publication) 111
3. Discussion et conclusion de l'étude 127

DISCUSSION GENERALE **129**

A. Rôle d'ASIC3 dans la douleur post-opératoire **129**

B. Activation d'ASIC3 par un lipide inflammatoire **133**

C. Propriété originale du canal ASIC3 humain **135**

PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS GENERALES **137**

BIBLIOGRAPHIE **138**

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : Acide Arachidonique

ADP: Adénosine DiPhosphate

AMP: Adénosine MonoPhosphate

ASIC: “Acid-Sensing Ion Channel”

ATP: Adénosine TriPhosphate

BLT : récepteur aux leucotriènes

Ca^{2+}: calcium

Ca_v : canal calcique dépendant du voltage

COX : CycloOXygénase

DMSO : DiMethyl SulfOxide

DRG : Ganglion de la Racine Dorsale

HEPES : acide HydroxyEthylPiperazineEthaneSulfonique

HETEs: acides HydroxyEicosaTétraEnoïques

HPETEs: acides HydroxyPeroxyEicosaTétraEnoïques

IP3: Inosotol triPhosphate

K^+: potassium

K_v: canal potassique dépendant du voltage

l: litre

LOX: LypoOxygénase

LPA : Acide LysoPhosphatidique

LPC : LysoPhosphatidylCholine

LPE : LysoPhophatidylEthanolamine

LPI : LysoPhosphatidylInositol

LPL : LysoPhosphoLipides

LPS : LysoPhosphatidylSérine

LT: LeucoTriène

min: minute

mV : milli-Volt

Na^+: sodium

NaCl : chlorure de sodium

Na_v : canal sodique dépendant du voltage

P2X : récepteur Purinergique ionotropique

P2Y : récepteur Purinergique métabotropique

pA : pico-Ampère

PAF: “Platelet Activating Factor”

PGE_2 : ProstaGlandine E_2

PGI_2: Prostaglandine I_2

pH: potentiel Hydrogène

PKA : Protéine Kinase A

PKC : Protéine Kinase C

PLA_2: PhosphoLipase A_2

RCPG: RéCepteur aux Protéines G

s: seconde

SNC: système nerveux central

SNP: système nerveux périphérique

TRPV: « Transient Receptor Potential Vanilloïd »

TABLE DES ILLUSTRATIONS

INTRODUCTION

Figure 1 : Le concept de la transmission de la douleur de Descartes. 6

Figure 2 : La douleur sur le visage de Laocoon lors de la guerre de Troie, ... 9

Figure 3 : La douleur de la guerre, Guernica, Picasso, 1937. 10

Figure 4 : La douleur physique, La colonne brisée, Frida Kahlo, 1944. 11

Figure 5 : Les voies de la douleur. 13

Figure 6 : Représentation schématique des fibres afférentes primaires et de leurs caractéristiques. 15

Figure 7: Les facteurs d'activation des nocicepteurs lors du processus inflammatoire consécutif à une lésion tissulaire. 18

Figure 7 bis: Schéma de la synthèse des médiateurs inflammatoires lipidiques à partir de la dégradation de la membrane plasmique. 24

Figure 8 : Eléments algogènes et inflammatoires à l'origine du déclenchement du signal nociceptif. 29

Figure 9 : La transmission du message nociceptif vers les neurones au niveau spinal. 34

Figure 10 : Schéma récapitulatif des voies de la perception et de la transmission de la douleur. 35

Figure 11 : Schéma des mécanismes d'action de différents analgésiques. 40

Figure 12 : Arbre phylogénétique des canaux de la famille ASIC. 51

Figure 13 : Représentation d'une sous-unité ASIC, distribution et assemblage en trimère pour former un canal. 54

Figure 14 : Représentation schématique d'une sous-unité d'un canal ASIC. 55

Figure 15 : Courants de type ASIC1a et ASIC3. 59

Figure 16 : Courant ASIC3 et excitabilité dans les neurones sensoriels. 60

Tableau 1 : Localisation et propriétés des différents ASIC. 65

Tableau 2 : Pharmacologie et régulations des ASIC. 67

Figure 17 : Effets des différentes toxines animales sur les canaux ASIC homo ou hétéromériques au niveau central et périphérique. 79

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Figure 18 : Photographies des différentes étapes de la chirurgie plantaire sur un rat anesthésié, selon le modèle de Brennan. 84

Résultats 1 : Effets des lysophospholipides (LPL) sur le courant ASIC3 de rat induit par une acidification modérée du milieu extracellulaire (de pH 7,4 à pH 7,0). 111

Résultats 2 : Effets de la LPC sur les courants ASIC3, ASIC1a et ASIC1b induits par une acidification (pH 6,6). 114

Résultats 3 : Effets de la LPC sur les courants ASIC3 induits par une acidification modérée (pH 7,0), dans les cellules COS. 116

Résultats 4 : Effets de déformateurs membranaires sur les courants ASIC3 induits par une acidification modérée (pH 7,0). 117

Résultats 5 : Effets de la LPC sur les courants ASIC3 et TRPV1 au pH physiologique. 119

Résultats 6 : Effets de la LPC et de la LPC NM sur les courants ASIC3 et TRPV1 à pH physiologique après 60 s d'application. 122

Résultats 7 : Effets combinés de la LPC et de l'acidité modérée (pH 7,0) sur l'activité des canaux ASIC3 *in vitro* et *in vivo* chez les rats. 124

DISCUSSION GENERALE

Figure 19 : Schéma de la théorie du « gate control » qui permet une modulation de la perception de la douleur suite à l'activation des fibres mécanosensibles. 132

L'homme est un apprenti, la douleur est son maître

Et nul ne se connaît tant qu'il n'a pas souffert.

(Alfred de Musset, « La Nuit d'Octobre », 1837)

INTRODUCTION GENERALE

La douleur a existé de tous temps, et l'Homme a toujours cherché à la combattre. Cette sensation désagréable est connue de nous tous. Elle est subjective et donc difficile à évaluer de manière claire, mais elle forge notre personnalité. La douleur est inévitable car elle nous protège face à notre environnement. En effet, des cas rares d'insensibilité congénitale à la douleur mettent en avant son rôle protecteur de l'intégrité de l'organisme. En absence de perception douloureuse, de nombreuses lésions cutanées, musculaires ou osseuses ne peuvent être évitées, à tel point que le pronostic vital de ces individus peut être engagé.

La douleur est un véritable enjeu de société car elle motive près de 2/3 des consultations médicales et on considère que 15 à 25 % de la population souffre de douleurs chroniques et cela augmente avec l'âge et chez les femmes en particulier. Par exemple, 18 à 50 % des français déclarent souffrir de lombalgies et 11 millions de français sont atteints de migraines (20 % des femmes et 7 % des hommes).

Afin de mieux prendre en charge et traiter les diverses pathologies douloureuses, il convient de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques spécifiques et efficaces. Pour cela, une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et neurologiques mis en jeu dans ces différentes douleurs est nécessaire.

INTRODUCTION

A. LA DOULEUR - LES DOULEURS

1. DEFINITIONS ET REPRESENTATIONS DE LA DOULEUR DANS L'HISTOIRE ET DANS L'ART

a. DEFINITIONS DE LA DOULEUR

La douleur est définie par l'Association Internationale d'Etude de la Douleur (IASP : « International Association for the Study of Pain ») comme « une expérience sensorielle et émotionnelle associée à un dommage tissulaire présent ou potentiel ou décrite en termes d'un tel dommage ».

La douleur est ainsi une expérience personnelle, subjective et complexe, qui repose sur des bases neurophysiologiques et neuropsychologiques.

✓ LA DOULEUR « PHYSIOLOGIQUE » OU NOCICEPTIVE

La douleur est une sensation désagréable mais néanmoins fondamentale. En nous alertant, la douleur dite « physiologique » ou nociceptive, nous permet de nous protéger. Elle fait suite à des stimulations environnementales nociceptives variées, transitoires, et localisées, et fait partie des mécanismes d'auto-défense de notre organisme. La blessure éventuelle déclenche les stratégies de retrait réflexe et comportemental, nous permettant ainsi de fuir un contact prolongé avec le stimulus nocif et d'éviter de graves lésions tissulaires.

Toutefois, lorsque cette perception physiologique perdure dans le temps ou est trop intense, elle devient pathologique et entrave la vie normale de l'individu. C'est cette dernière douleur, dite chronique, qu'il convient d'essayer de réduire et de maîtriser.

✓ LES DOULEURS CHRONIQUES: DOULEURS INFLAMMATOIRES ET NEUROPATHIQUES

Les douleurs chroniques sont dues à des dommages tissulaires et à des excès de nociception durables, généralement associés à une inflammation tissulaire ou à des lésions nerveuses qui peuvent se produire dans certaines pathologies comme le diabète, l'arthrite ou la croissance tumorale. L'altération des propriétés des nerfs périphériques, se traduit par une augmentation des décharges électriques spontanées, une dégradation de la conduction nerveuse et/ou une modification de la libération des neurotransmetteurs. Ces effets sont délétères pour la santé, la vie professionnelle et sociale de l'individu qui en souffre.

✓ NOTION DE SEUIL DE PERCEPTION ET DE TOLERANCE A LA DOULEUR

LE SEUIL DE PERCEPTION

Le seuil de perception de la douleur correspond à l'intensité pour laquelle un stimulus thermique, mécanique, chimique…, devient douloureux. Ce seuil de perception nociceptive est relativement identique chez tous les individus à partir du moment où aucune lésion du système nerveux n'existe au niveau périphérique ou central. Certaines pathologies ou lésions tissulaires, qui engendrent des altérations du système nerveux, peuvent être à l'origine d'hypersensibilité ou d'hyposensibilité face à un stimulus. L'hypersensibilité génère une allodynie ou une hyperalgie. L'allodynie est définie comme une douleur déclenchée par une stimulation normalement non douloureuse. Par exemple, lors d'un coup de soleil, le contact de la peau lésée avec l'eau tiède de la douche, normalement indolore, devient douloureux. L'hyperalgie est une douleur exagérée en réponse à une stimulation nocive. Elle peut être située au sein du tissu lésé, on parle alors d'hyperalgie primaire. Ou bien, elle peut faire intervenir une sensibilisation et se retrouver au-delà du tissu lésé, on parle alors d'hyperlagie secondaire. L'hyposensibilité, au contraire, va conduire à des réponses douloureuses minimisées.

LE SEUIL DE TOLERANCE

Le seuil de tolérance à la douleur est subjectif et varie de manière importante selon les individus et même, pour un individu donné, selon les circonstances de sa vie. Ces variations individuelles sont considérables et font appel à des facteurs physiques et psychologiques.

L'âge, les maladies ou certaines fluctuations hormonales font partie de ces facteurs physiques. L'équilibre psychologique est très important également : en période de dépression, de difficultés personnelles, sociales ou professionnelles, le seuil de tolérance à la douleur peut être diminué.

La chronicité de la douleur modifie aussi le seuil de tolérance. En effet, face à la répétition, la durée et la persistance de la douleur, l'individu ne peut faire preuve d'habituation et devient de plus en plus sensible. La douleur est alors perçue comme insupportable.

En revanche, des conditions extrêmes peuvent induire une augmentation du seuil douloureux. C'est le cas de facteurs physiques (traumatismes sportifs, blessures de guerre…) ou de facteurs comportementaux, d'ordre culturel ou de croyances par exemple. Ces agents de motivation forte peuvent inciter l'individu à se surpasser et à tolérer certaines douleurs qu'il n'aurait pas supportées en conditions normales.

b. LA REPRESENTATION DE LA DOULEUR DANS L'HISTOIRE ET DANS L'ART

✓ LA REPRESENTATION DE LA DOULEUR DANS L'HISTOIRE

De tous temps, l'Homme et la médecine ont cherché à soulager les souffrances, qu'elles soient physiques ou morales. Toutefois, selon les époques, les croyances et les civilisations, la douleur a différentes significations. Elle est vue comme une fatalité, une épreuve divine pour racheter ses mauvaises actions ou, à l'opposé, comme une expérience insupportable et inutile contre laquelle il faut lutter par tous les moyens. Ainsi, selon l'influence qu'elle subit, la médecine a adopté des comportements contradictoires, tels que le combat contre la douleur ou la résignation. A l'heure actuelle, la prise en charge de la douleur est encore un important problème pour le corps médical, puisque le traitement de certains types de douleurs chroniques, notamment, reste encore complexe à notre époque.

L'ANTIQUITE

Dès l'Antiquité, vers le 3ème siècle avant J-C, les grands « médecins-philosophes » comme Platon, Aristote ou Démocrite, considéraient la douleur comme une altération du corps et non pas comme un phénomène divin. Démocrite invoque la théorie des quatre humeurs qui composent l'organisme (le sang, le phlegme, la bile blanche et la bile noire). Théorie qui persistera jusqu'au 17ème siècle. Selon lui, la maladie est une altération des humeurs. Hippocrate et son école utilisaient déjà de nombreux remèdes contre les céphalées, les douleurs articulaires et les douleurs de l'accouchement. La pharmacopée d'Hippocrate (Corpus hippocratique) comportait de nombreuses drogues d'origine végétale, aux vertus sédatives et analgésiques provenant de la belladone, du saule, du suc de pavot (opium)… Nous savons maintenant que l'écorce de saule contient de l'acide salicylique (molécule active de l'aspirine) et que le suc de pavot contient de nombreux alcaloïdes (morphine, codéine).

Quelques cinq siècles plus tard, les médecins grecs continuent de faire évoluer la médecine. Celse décrit les quatre *« or »* du phénomène d'inflammation (*dolor, calor, rubor* et *tumor*), alors que Galien, grâce à la pratique des dissections animales, démontre le rôle conducteur des nerfs, et le cerveau comme le centre du psychisme. Le cœur reste le centre des sens et de l'âme. Les remèdes végétaux et l'opium sont toujours utilisés à cette époque comme analgésiques. Les chocs électriques pour lutter contre certaines douleurs auraient été découverts dans l'Egypte ancienne lorsque, accidentellement, un patient souffrant de douleur articulaire aurait été soulagé suite à un contact avec un poisson torpille lors d'un bain de mer.

LE MOYEN-AGE

Au cours du Moyen-âge, le christianisme domine l'Occident. La douleur est alors perçue comme une épreuve envoyée par Dieu qu'il faut accepter et supporter en silence, à l'image

de la souffrance du Christ. A cette époque, la douleur n'a qu'une valeur divine expiatoire. L'interdiction par l'Eglise des vivisections, des dissections animales et des études sur les cadavres, va freiner les découvertes en anatomie et physiologie, conduisant à un immobilisme, voire une régression des connaissances scientifiques. Puis, les nombreuses guerres, famines et épidémies vont mener à une augmentation importante du seuil de tolérance à la douleur.

LA RENAISSANCE

Aux alentours du 16ème siècle, les médecins et philosophes vont remettre en question l'approche de la douleur. La douleur devient indépendante du péché originel et perd sa valeur rédemptrice. Les connaissances en anatomie et neurophysiologie se développent suite à la levée de l'interdiction de disséquer par l'Eglise. Leonard de Vinci et Michel-Ange montrent une grande connaissance de l'anatomie. André Vésale décrit le système nerveux périphérique, le cerveau et les organes des sens. Il distingue la substance grise et la substance blanche et individualise les noyaux gris centraux comme le thalamus. Il étudie le fonctionnement des nerfs, qu'il décrit comme des tubes creux dans lesquels s'écoule le phlegme sécrété par le cerveau. La théorie des humeurs est toujours présente. Puis, René Descartes étudie les sens de la douleur et considère que le centre de convergence et d'analyse des sensations est situé dans le cerveau (**Figure 1**). En 1641, il avance la première théorie logique sur la douleur (Méditations métaphysiques) : *"[…] lorsque les nerfs qui sont dans le pied sont remués fortement, et plus qu'à l'ordinaire, leur mouvement, passant par la moelle de l'épine du dos jusqu'au cerveau, fait une impression à l'esprit qui lui fait sentir quelque chose, à savoir la douleur, comme étant dans le pied par laquelle l'esprit est averti et excité à faire son possible pour en chasser la cause, comme très dangereuse et nuisible au pied.[...]".*



Figure 1 : Le concept de la transmission de la douleur de Descartes.

Descartes décrivit les voies de la douleur et initia l'idée révolutionnaire que le système nerveux central pouvait influencer la perception de la douleur.

LE 19EME SIECLE

Au 19ème siècle, la compréhension et l'étude de l'anatomie et des mécanismes physiologiques vont nettement progresser, avec notamment l'essor de la microscopie. C'est un chirurgien des armées de Napoléon, le baron Dominique-Jean Larrey, qui va faire considérablement progresser la prise en charge de la douleur en prenant part aux grands débats sur l'anesthésie qui vont avoir lieu à l'Académie de Médecine en 1828. Malgré la réticence et le scepticisme de certains de ses collègues, il va défendre une médecine plus humaine et la mise en place de l'anesthésie générale. Au cours de ce siècle, la médecine va subir de grandes transformations. Des corrélations sont faites entre les connaissances de l'anatomie et la pratique clinique. Les premiers analgésiques sont synthétisés, comme l'aspirine en 1897. La morphine, principe actif de l'opium, est isolée et utilisée pour la première fois pendant la 1ère guerre mondiale.

DE NOS JOURS

De nos jours, bien qu'il soit largement admis que la douleur n'est pas inéluctable, sa prise en charge et son traitement peuvent rester difficiles à gérer pour le corps médical et demandent une vision globale et une approche pluridisciplinaire. La douleur n'est plus une fatalité mais reste au cœur de nombreuses pathologies et demeure une priorité de santé publique. Afin de mieux la combattre, il s'agit avant tout de mieux comprendre les mécanismes fins qui la sous-tendent. C'est pourquoi, de nos jours, la recherche est active dans ce domaine.

✓ LA REPRESENTATION DE LA DOULEUR DANS L'ART

Depuis longtemps la douleur a été symbolisée dans l'art. Dès l'Antiquité, la douleur est fréquemment représentée dans les peintures et sculptures (**Figure 2**). Et elle continuera de l'être jusqu'à nos jours, que ce soit des souffrances physiques et psychologiques, faisant suite à des guerres, comme l'illustre par exemple le célèbre « Guernica » de Picasso (**Figure 3**), ou bien, des douleurs physiques, plus personnelles, représentées par exemple par l'autoportrait de la célèbre artiste mexicaine Frida Kahlo (**Figure 4**).

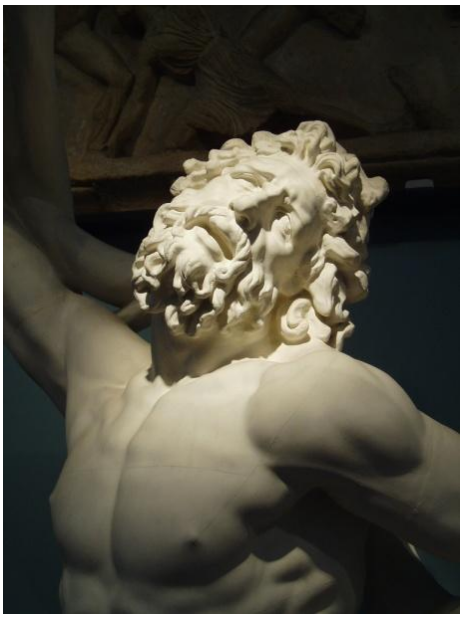


Figure 2 : La douleur sur le visage de Laocoon lors de la guerre de Troie, 2ème siècle avant J-C.

Cette statue en marbre blanc reprend l'original réalisé en bronze. Elle représente la douleur sur le visage de Laocoon, figure religieuse troyenne, qui, alors qu'il s'opposait à l'entrée des grecs dans la ville de Troie, fut, par une intervention divine favorable aux Grecs, étouffé et mordu par des serpents marins.



Figure 3 : La douleur de la guerre, Guernica, Picasso, 1937.

Le célèbre Guernica de Picasso décrit les horreurs de la seconde guerre mondiale et les douleurs physiques et souffrances psychologiques qui s'en suivent.

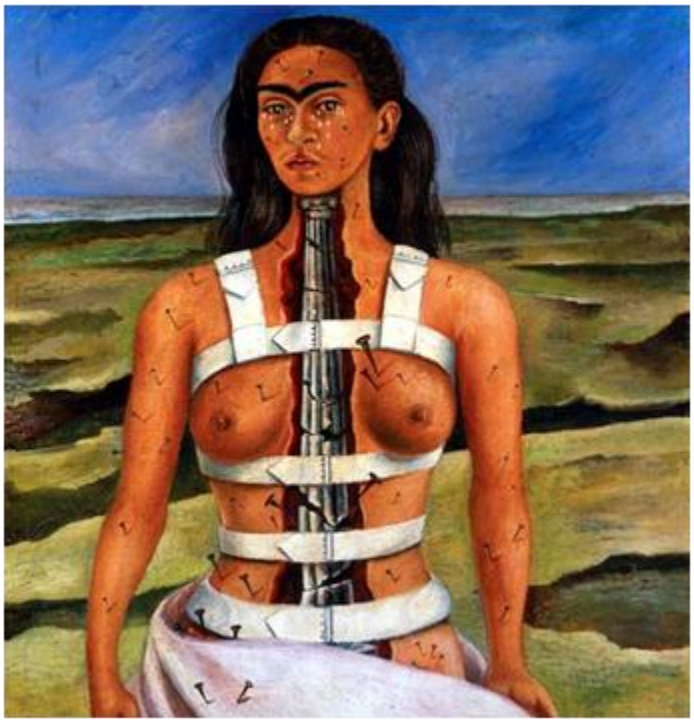


Figure 4 : La douleur physique, La colonne brisée, Frida Kahlo, 1944.

Dans cette œuvre, Frida Kahlo dépeint sa jeune souffrance suite un accident qui lui a broyé les membres, la colonne vertébrale et les côtes et l'a contrainte à de nombreux mois de soins intenses.

2. PHYSIOLOGIE DE LA DOULEUR

a. LA PERCEPTION AU NIVEAU PERIPHERIQUE

✓ LES NOCICEPTEURS ET LES FIBRES AFFERENTES PRIMAIRES

La douleur nociceptive, ou par excès de nociception, fait suite à une activation des fibres nerveuses périphériques sensorielles, appelées nocicepteurs, par des stimulations chimiques, thermiques ou mécaniques (Basbaum et al, 2009) (**Figure 5**). Ces fibres sensorielles ou afférences primaires possèdent une extrémité périphérique qui innerve la peau, les muscles et les viscères. Les corps cellulaires des nocicepteurs, présents dans l'ensemble du corps, sont localisés dans les ganglions de la racine dorsale de la moelle épinière (DRG). Ceux qui innervent la face sont situés au niveau du ganglion trijumeau (Basbaum et al, 2009). Ces fibres répondent de manière graduelle aux stimulations périphériques nocives qu'elles perçoivent. Elles envoient un signal, sous forme de message électrique (potentiels d'action), qui est transmis de la périphérie à la corne dorsale de la moelle épinière, où les afférences primaires font synapse avec les neurones intrinsèques de la moelle (Julius & Basbaum, 2001). De là, les neurones de projection vont activer les centres supérieurs du cerveau, où le message électrique est traduit en message douloureux conscient. Il existe différents types de nocicepteurs de la douleur : les nocicepteurs somatiques et les nocicepteurs viscéraux. La douleur somatique est causée par un dommage cutané, musculaire ou osseux alors que la douleur viscérale fait suite à une lésion des organes internes (Olesen et al, 2012).

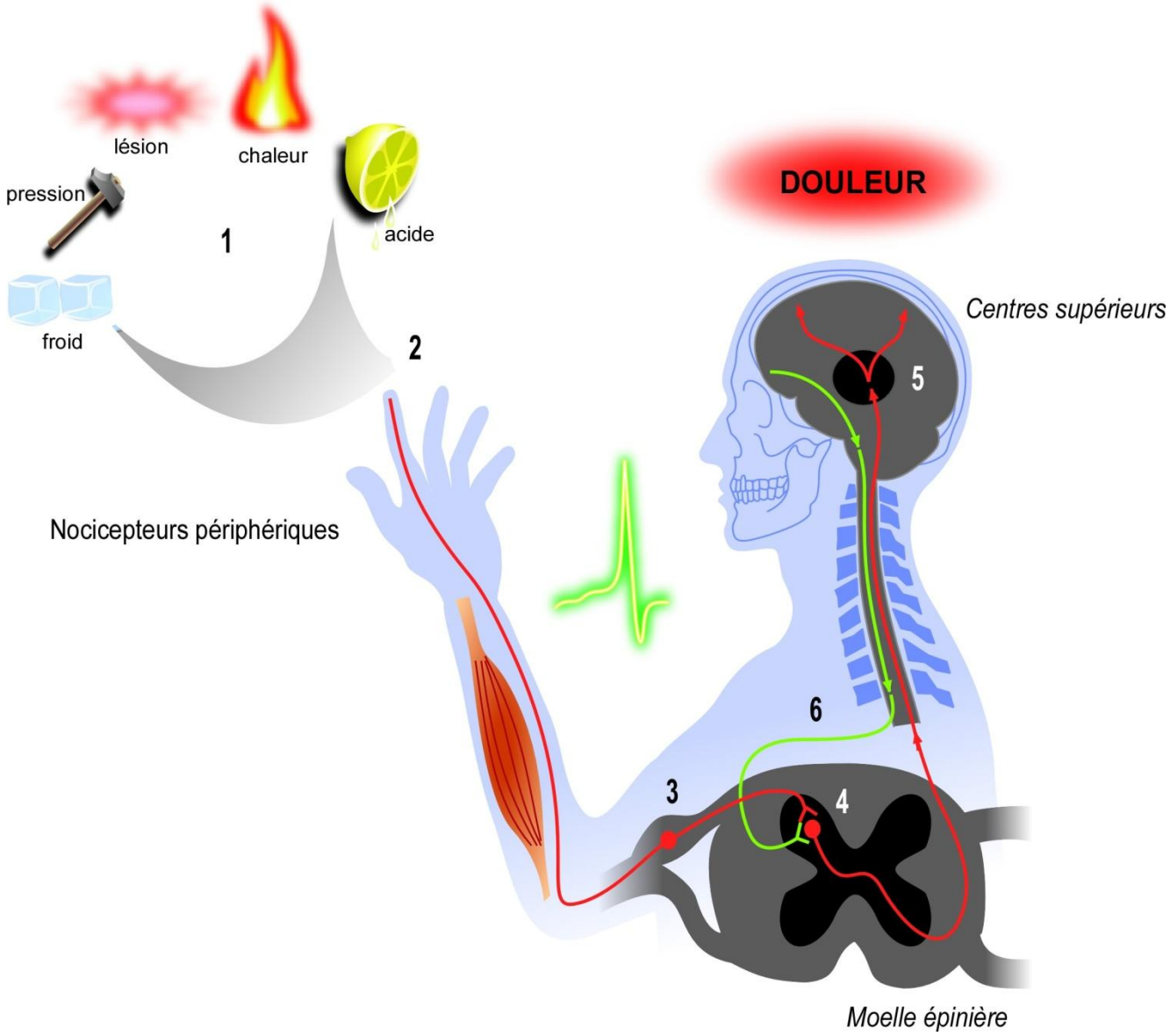


Figure 5 : Les voies de la douleur.

Les signaux douloureux en provenance de l'environnement (1) sont perçus par les neurones sensoriels en périphérie (2), dont les corps cellulaires se situent dans les ganglions de la racine dorsale de la moelle (3). Ces afférences nerveuses transmettent un signal électrique à la moelle épinière, où les neurones de la corne dorsale sont activés (4). Cet influx est ensuite transmis aux centres supérieurs de l'encéphale (5) où les signaux électriques sont traduits en message douloureux conscient. En retour, le cerveau peut moduler cette activité entrante par des systèmes de contrôles descendants (6).

Il existe trois grands types de fibres afférentes primaires, les fibres Aβ, Aδ et les fibres C (**Figure 6**). Ces fibres répondent à différents types d'informations et ont des propriétés spécifiques (D'Mello & Dickenson, 2008). Les fibres Aβ, myélinisées, de gros diamètre, sont rapides (35-90 m/s) et peu impliquées dans la transmission douloureuse. Elles transmettent plutôt des informations tactiles fines comme les effleurements et les caresses. Les fibres Aδ sont myélinisées mais moins rapides (6-36 m/s) que les Aβ (Olesen et al, 2012). Les fibres Aδ sont principalement spécialisées dans la détection des signaux mécaniques (piqûres et pincements) et thermiques potentiellement nocifs. Elles peuvent déclencher une réponse assez rapide et des mouvements réflexes qui permettent la protection de l'organisme. Ces fibres Aδ jouent également un rôle important dans l'hyperalgie. Le troisième type de fibre, les fibres C, sont fines, non myélinisées, et transmettent les stimuli plus lentement (< 1 m/s). Elles constituent la majorité des nocicepteurs. Elles sont principalement polymodales et répondent aux forts stimuli mécaniques, thermiques ou chimiques. Toutefois, certaines sont spécialisées dans la détection d'un seul type de stimulus comme la chaleur ou le pincement. De plus, il existe des fibres sensorielles silencieuses qui ne répondent pas aux stimulations de haute intensité dans les conditions normales mais sont activées de manière spontanée et répondent aux stimuli non nocifs dans des conditions inflammatoires (Michaelis et al, 1996).

Les principales différences entre l'innervation de la peau, des muscles et des viscères résident dans l'organisation des afférences nociceptives au niveau de la moelle. La distribution spinale des afférences cutanées est précise alors que les afférences des tissus profonds sont organisées de manière plus diffuse et parsemée (Olesen et al, 2012). Cela explique les différences cliniques entre les douleurs cutanées et les douleurs musculaires ou des tissus profonds. Les douleurs superficielles sont décrites et localisées de manière précise. Les douleurs profondes musculaires ou viscérales restent vagues et difficiles à caractériser (Olesen et al, 2012).

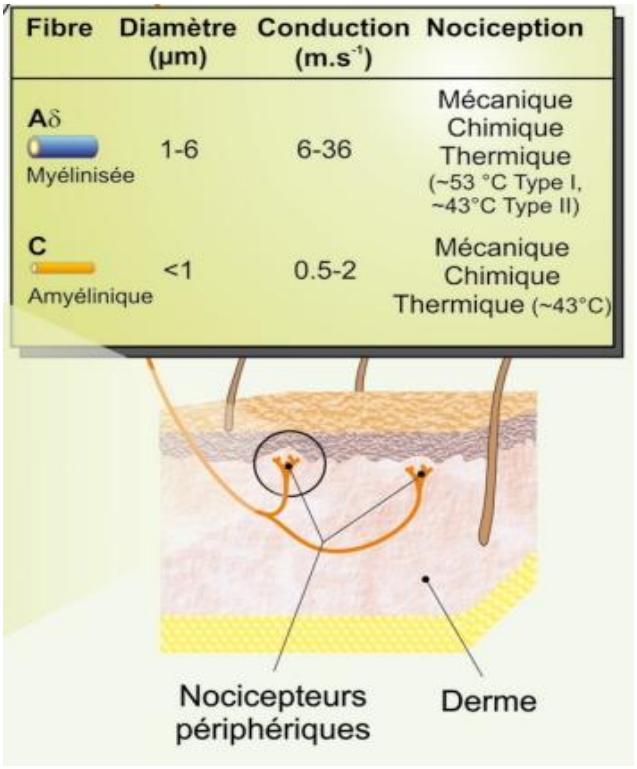


Figure 6 : Représentation schématique des fibres afférentes primaires et de leurs caractéristiques.

Les fibres A (β et δ), de gros diamètre, conduisent rapidement les informations nociceptives mécaniques, chimiques et thermiques. Les fibres C, fines et non myélinisées conduisent plus lentement le signal nociceptif d'ordre mécanique, chimique ou thermique.

D'après (Weiss & De Waard, 2006).

✓ LES FACTEURS D'ACTIVATION ET DE SENSIBILISATION DES NOCICEPTEURS

De nombreuses conditions physiopathologiques comme les lésions, l'invasion tumorale, l'ischémie, provoquent la libération de facteurs biochimiques, à l'origine de la réaction inflammatoire (Van de Ven & John Hsia, 2012), (Grivennikov et al, 2010), (Huang et al, 2006). Certains de ces médiateurs inflammatoires activent directement les nocicepteurs périphériques et conduisent à une douleur spontanée. D'autres, agissent indirectement, via des cellules du système immunitaire pour stimuler la libération d'agents algogènes (qui induisent une douleur) (Kidd & Urban, 2001). Ces molécules peuvent modifier la perméabilité aux ions des canaux ioniques présents sur la membrane des nocicepteurs ou abaisser leur seuil d'activation. Cela conduit à une hyperalgie périphérique primaire. La réaction inflammatoire est fondamentale dans les processus douloureux chroniques puisqu'elle module, non seulement l'activité des fibres sensorielles au moment de la lésion, mais également à plus long terme.

L'altération tissulaire conduit donc à l'accumulation de facteurs endogènes inflammatoires, libérés par les nocicepteurs ou par des cellules non nerveuses. Au nombre des cellules non nerveuses figurent à la fois des cellules sanguines circulantes (polynucléaires basophiles et neutrophiles, plaquettes, lymphocytes), qui migrent vers le tissu interstitiel, et des cellules résidantes des tissus (mastocytes, macrophages, cellules endothéliales, kératinocytes, fibroblastes) (Basbaum et al, 2009). De nombreux médiateurs contribuent à l'inflammation. Nous allons décrire ici quelques-uns des plus importants, tout en essayant de les classifier selon les cellules qui les produisent. Tout d'abord, les cellules lésées libèrent des protons, de l'ATP, du monoxyde d'azote et du lactate. Par la suite, le recrutement des cellules immunitaires génère la libération d'autres médiateurs comme l'histamine, la sérotonine, les cytokines et des facteurs de croissance. La voie de l'acide arachidonique (AA) est également activée lors du processus inflammatoire, et conduit à la production de prostanoïdes et de leucotriènes. L'ensemble des ces molécules algogènes, ou « soupe inflammatoire », forme une solution acide et hypertonique.

LES MOLECULES LIBEREES PAR LES CELLULES LESEES

o Les protons (H^+)

En réponse à une lésion des tissus périphériques suite à une blessure, une opération chirurgicale, une inflammation, une ischémie ou encore dans le cas de certaines tumeurs, des protons sont libérés. Cette acidose, au sein du tissu lésé, reste difficile à évaluer de manière précise mais elle pourrait atteindre des valeurs de pH comprises entre 6,9 et 6,5, selon la nature des lésions (Woo et al, 2004), alors que la valeur de pH physiologique se situe autour de 7,4.

Ces diminutions du pH tissulaire, plus ou moins rapides, et plus ou moins fortes, activent certains récepteurs, comme les canaux ioniques TRPV1 et ASIC, qui sont sensibles aux protons (**Figure 7**).

Les canaux TRPV1 (« Transient Receptor Potential Vanilloid 1») sont des canaux cationiques, dépolarisants, localisés dans les fibres afférentes sensorielles primaires (Tominaga et al, 1998), (Caterina et al, 1997), (Caterina et al, 1999). Ils sont polymodaux, activés par une température nocive (> 43 °C), par les protons (pH < 5,9) et par la capsaïcine, un vanilloïde, constituant des piments (l'activation de ces canaux par le chaud et par la capsaïcine explique la sensation de brûlure ressentie lors de l'ingestion de piment). Les protons activent directement les canaux TRPV1, conduisant à la réduction de leurs seuils d'activation thermiques et à l'augmentation des réponses au chaud. Cette sensibilisation accrue explique, au moins en partie, les allodynies et les hyperalgies comportementales. L'étude des souris porteuses du gène invalidé pour ce canal montre son rôle important dans les mécanismes inflammatoires qui génèrent des hyperalgies thermiques (Caterina et al, 2000). De plus, d'autres agents de la soupe inflammatoire tels que les lipides, la bradykinine, l'ATP et le NGF (« Nerve Growth Factor »), modulent et sensibilisent les canaux TRPV1, via des mécanismes directs ou indirects, qui eux aussi provoquent une hypersensibilité thermique lors de l'inflammation.

Les canaux ASIC pour « Acid Sensing Ion Channels » sont des canaux cationiques, principalement sodiques, appartenant à la famille des canaux DEG/ENaC. Ils sont activés par l'acidification extracellulaire qui se produit notamment après une lésion tissulaire et un stress métabolique. Il existe différents types de canaux ASIC qui s'assemblent en homo ou hétéro-trimères, et qui présentent des profils d'expression et des sensibilités au pH qui leurs sont propres. Les canaux contenant la sous-unité ASIC3 sont particulièrement exprimés par les nocicepteurs, et plus spécifiquement par les fibres qui innervent les muscles squelettiques et cardiaques. Dans ces tissus, le métabolisme anaérobie conduit à une accumulation d'acide lactique et de protons, provoquant l'activation des nocicepteurs et des douleurs musculo-squelettiques et cardiaques (Immke & McCleskey, 2001b). De manière intéressante, les canaux qui expriment la sous-unité ASIC3 s'ouvrent en réponse à de modestes diminutions du pH (de pH 7,4 à pH 7,0), atteintes lors d'une ischémie cardiaque (Yagi et al, 2006). Les canaux ASIC seront décrits de manière plus approfondie dans la deuxième partie de ce travail.

L'activation des ASIC, associée à celle des canaux TRPV1 sensibilisés par les protons et par la chaleur ambiante, génère une dépolarisation de la membrane du neurone sensoriel. Ce changement de potentiel active les canaux dépendant du voltage et aboutit à la génération de potentiels d'action. L'ensemble de ces processus conduit à l'excitabilité du neurone en conditions d'acidose.

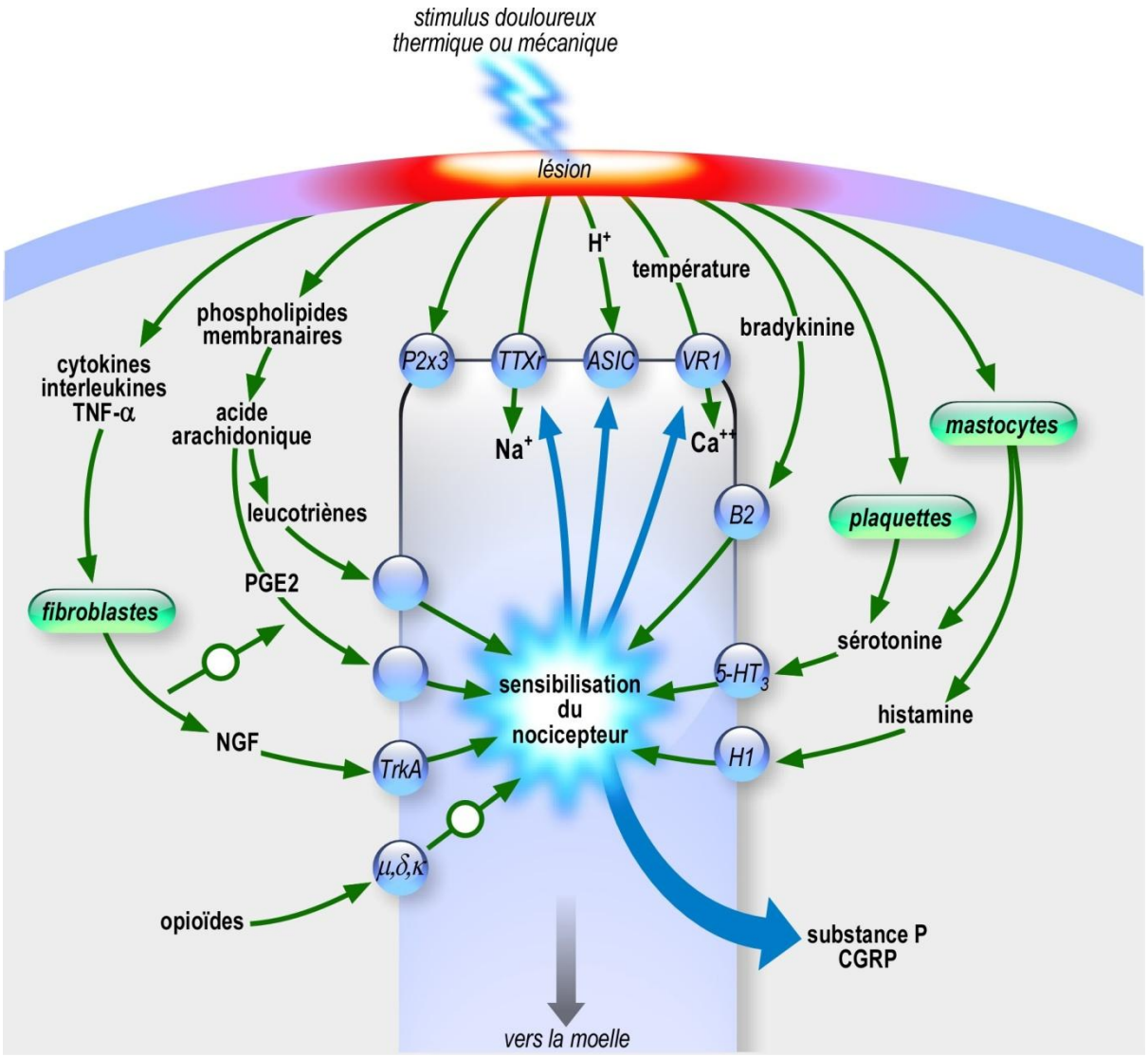


Figure 7: Les facteurs d'activation des nocicepteurs lors du processus inflammatoire consécutif à une lésion tissulaire.

Suite à une lésion tissulaire, de nombreux facteurs sont produits par les tissus lésés eux-mêmes (H^+, ATP, chaleur, bradykinine) et activent directement les canaux ou récepteurs présents à l'extrémité du neurone sensoriel qui innerve la zone. La dégradation des phospholipides membranaires conduit à la production d'AA, de leucotriènes, de prostaglandines… L'activation des cellules du système immunitaire entraîne la libération de sérotonine, de PAF (« Platelet Activating Factor »), d'histamine… Dans un deuxième temps, les molécules proalgiques se fixent sur leurs récepteurs propres présents sur le nocicepteur et activent des voies de signalisation intracellulaire conduisant à une sensibilisation du nocicepteur ou à un réveil des nocicepteurs silencieux. Cette activation, sensibilisation ou réveil des nocicepteurs conduit à la production de substance P et CGRP, des neuropeptides proalgiques.

D'après l'ouvrage Institut UPSA de la douleur, 2007, B. Bannwarth.
« Douleur, inflammation et interactions système nerveux/système immunitaire »

o L'ATP

L'adénosine et ses dérivés (AMP, ADP, ATP) sont délivrés par les cellules endothéliales vasculaires et épithéliales. Ces molécules peuvent générer directement une douleur en activant les récepteurs purinergiques ionotropiques (P2X) et métabotropiques (P2Y). Par exemple, chez l'Homme, l'ATP produit une douleur aiguë lorsqu'il est appliqué sur la peau (Hamilton et al, 2000), (Bleehen & Keele, 1977). Les récepteurs à l'ATP ont été découverts dans les années 1990 (Bean & Friel, 1990), (Brake et al, 1994), (Valera et al, 1994), (Chen et al, 1995). Les récepteurs P2X3 sont exprimés exclusivement dans les neurones sensoriels (Chen et al, 1995) (**Figure 7**) où ils peuvent être co-exprimés avec les P2X2 et former des hétéromères. Ces canaux sont impliqués dans les douleurs chroniques neuropathiques et inflammatoires (Khakh & North, 2006). La réduction de l'expression ou l'inhibition pharmacologique de P2X3 chez les rongeurs atténue la douleur inflammatoire et l'allodynie mécanique (Souslova et al, 2000), (Cockayne et al, 2000), (North, 2003), (Jarvis et al, 2002). Les antagonistes sélectifs de ces récepteurs sont efficaces dans le traitement des douleurs neuropathiques et inflammatoires et sont actuellement développés en vue d'une utilisation thérapeutique (Khakh & North, 2006).

o Le lactate

Suite à une ischémie, le métabolisme anaérobie du glucose peut conduire à une production élevée de lactate, qui serait à l'origine de la douleur de l'angine de poitrine. L'augmentation importante du lactate dans les neurones sensoriels innervant le cœur accroit considérablement l'activité des canaux ASIC3, pouvant même générer une excitabilité neuronale à pH 7,0 (Immke & McCleskey, 2001b). Le lactate potentialise les courants ASIC activés par des acidoses faibles (Immke & McCleskey, 2001b), mais n'active pas directement ces canaux (Li et al, 2010). L'effet du lactate sur ASIC3 serait dû à son rôle de chélateur du Ca^{2+}. En effet, la réduction du Ca^{2+} extracellulaire permet la libération d'un site de haute affinité aux protons sur le canal ASIC3. Les protons se fixent alors davantage sur le canal, conduisant à sa sensibilisation (Immke & McCleskey, 2001b), (Immke & McCleskey, 2003).

o Les radicaux libres : l'exemple du monoxyde d'azote (NO)

Le NO est un gaz libre produit par trois enzymes appelées NO synthases. L'une d'entre elles, appelée iNOS, est inductible et surexprimée en condition inflammatoire. Lors de l'inflammation, de grandes quantités de NO sont générées par les cellules. Le NO est pourvu de propriétés proinflammatoires (participation à la vasodilatation, l'œdème, l'érythème…) et, contrairement aux autres médiateurs de l'inflammation, il possède des actions pro et anti-nociceptives au niveau périphérique.

De nombreux modèles animaux ont montré l'implication du NO dans les douleurs inflammatoires (Petho & Reeh, 2012). Dans un premier temps, le NO participe aux actions excitatrices et sensibilisatrices de la bradykinine, suggérant un rôle pronociceptif. Des

donneurs de NO induisent une hyperalgie au chaud chez la souris (Miyamoto et al, 2009) et augmentent la douleur évoquée par l'acide chez l'Homme (Cadiou et al, 2007). De même, dans des modèles inflammatoires, les NO synthases sont surexprimées (De Alba et al, 2006), (Chen et al, 2008) et génèrent une hyperalgie mécanique (De Alba et al, 2006), ou thermique (Chen et al, 2010). De plus, le NO endogène contribuerait aux effets pronociceptifs de la PGE_2 chez le rat (Chen & Levine, 1999). Les donneurs de NO activent les canaux TRPV1 et TRPA1 (Miyamoto et al, 2009), conduisant à des effets nociceptifs qui sont réduits lors de l'abolition génique de ces canaux. Les canaux ASIC sont également potentialisés par le NO, via un mécanisme direct, impliquant la boucle extracellulaire du canal (Cadiou et al, 2007). Dans un second temps, le NO a des effets périphériques antinociceptifs par activation des canaux potassiques sensibles à l'ATP et par blocage des canaux Na_v dans la membrane des nocicepteurs (Petho & Reeh, 2012). Cela conduit à une hyperpolarisation et une réduction de l'excitabilité.

LES MOLECULES PRODUITES A LA SUITE DU DOMMAGE TISSULAIRE

o La bradykinine

La bradykinine est un acteur majeur de la phase précoce de la cascade inflammatoire, générant une vasodilatation et une extravasation plasmatique (épanchement de plasma dans les tissus interstitiels à l'origine de l'œdème). Elle se fixe sur ses récepteurs B1 et B2, présents notamment dans les neurones sensoriels (Levy & Zochodne, 2000) (**Figure 7**). L'activation de ces récepteurs conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires (telles que le TNFα *(« Tumor Necrosis Factor »*) et les interleukines 1 et 6), d'acide arachidonique (AA) et de monoxyde d'azote (NO). Elle déclenche également la libération de peptides (CGRP *(« Calcitonine Gene Related Protein »)* et neurokinines) par les terminaisons des afférences primaires et d'histamine et de sérotonine par les mastocytes (**Figure 8**). Des modèles animaux ou cliniques en condition inflammatoire ont montré une augmentation des niveaux de bradykinine dans le plasma (Hargreaves et al, 1988), ainsi qu'une augmentation de l'expression des récepteurs B1 et B2 (Hamza et al, 2010). L'activation et la surexpression des récepteurs B2 (Levy & Zochodne, 2000) modulent l'activité de différents types de canaux ioniques. Les canaux TRPV1, TRPA1 et les canaux sodiques dépendant du voltage (Na_V), présents dans les neurones sensoriels, peuvent être potentialisés par la bradykinine. En revanche, les canaux TRPM8 et les canaux potassiques dépendant du voltage (K_v) K_v7 seraient inhibés par la bradykinine (Petho & Reeh, 2012). Ces régulations conduisent à une action pro-nociceptive en conditions inflammatoires et participent aux effets excitateurs et sensibilisants de la bradykinine dans divers modèles d'inflammation ou de neuropathies (Levy & Zochodne, 2000), (Petho & Reeh, 2012). De nombreuses études effectuées sur l'Homme, sur le singe et sur les rongeurs ont mis en évidence un comportement douloureux suite à des applications de bradykinine sur la peau, dans le

muscle et dans le péritoine (Eisenbarth et al, 2004), (Khan et al, 1992), (Babenko et al, 1999). De plus, des travaux électrophysiologiques ont documenté une activation des fibres afférentes des neurones sensoriels de différents organes par cette molécule (Szolcsanyi, 1987), (Longhurst et al, 1984), (Pan et al, 1994).

Les effets excitateurs très variés de la bradykinine, en plus de moduler l'activité de différents canaux ioniques, impliquent la formation des prostanoïdes (Voir la partie sur les lipides inflammatoires).

o La sérotonine et l'histamine

La sérotonine (5-HydroxyTryptamine (5-HT)) et l'histamine sont produites par les cellules sanguines et les cellules du système immunitaire, activées lors de l'inflammation (**Figure 7**). Les plaquettes produisent la sérotonine et les mastocytes sont à l'origine de sérotonine et d'histamine. Ces molécules proinflammatoires et algogènes se fixent à leurs récepteurs propres, présents notamment sur la membrane du nocicepteur. La sérotonine, en activant ses récepteurs 5-HT_3 et/ou 5-HT_2, génère une dépolarisation membranaire et/ou l'activation des voies de la PKA et de la PKC, qui conduisent à la sensibilisation du nocicepteur. La sérotonine a également un rôle dans le système trigémino-vasculaire, où les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B}, par exemple, sont impliqués dans la pathologie migraineuse (Ates et al, 2013). Les effets physiologiques de l'histamine sont divers et dépendent de l'action des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). L'histamine a un rôle analgésique au niveau du système nerveux central. En revanche, lors de l'inflammation, elle agit principalement sur son récepteur H_1, au niveau du nocicepteur. L'activation de cette voie sensibilise le neurone sensoriel, révélant un rôle proalgique en périphérie (Yu et al, 2013).

Les effets de la sérotonine et de l'histamine conduisent à la sensibilisation du neurone sensoriel et abaissent notamment le seuil d'excitabilité des canaux TRPV1 (Loyd et al, 2011).

o Les cytokines

Il existe une grande variété de cytokines au sein du site inflammatoire (**Figure 7**). Elles sont produites par la plupart des cellules et interagissent entre elles de manière complexe. La nature, la concentration et les rôles divers des cytokines au sein du site inflammatoire déterminent la réponse biologique finale. Les cytokines sont impliquées dans l'instauration, le développement et le maintien de l'inflammation. Parmi elles, citons l'interleukine 1, qui active l'expression de nombreux gènes qui interviennent dans la synthèse de médiateurs inflammatoires comme la phospholipase A_2 (PLA_2), la COX-2, certaines cytokines, des NO synthases… Les cytokines régulent ainsi les réponses inflammatoires et immunitaires. Une autre cytokine importante est le TNFα (« Tumor Necrosis factor »), qui induit la synthèse de la COX-2 (Tyagi et al, 2012) et provoque la libération de noradrénaline (hormone adrénergique et neurotransmetteur). Dans leur ensemble, les cytokines et les mécanismes qu'elles modulent conduisent à une sensibilisation des nocicepteurs.

o Les neurotrophines

Parmi les neurotrophines, le NGF (« Nerve Growth Factor »), qui est produit par les fibroblastes grâce à l'action des cytokines (Yoshida et al, 1992) (**Figure 7**), est un important facteur de l'hyperalgie inflammatoire. Il se fixe à son récepteur à activité tyrosine kinase (TrkA) et est transporté au niveau du corps cellulaire du neurone. A ce niveau, il augmente la transcription de précurseurs peptidiques impliqués dans la douleur comme la substance P et le neuropeptide CGRP (« Calcitonin Gene-Related Peptide »), conduisant à une hyperalgésie. Le NGF augmenterait aussi l'expression d'autres neurotrophines dans les fibres C, comme le BDNF (« Brain Derivated Neurotrophin Factor »). L'ensemble de ces mécanismes est à l'origine d'une sensibilisation centrale.

o L'agmatine et les polyamines

Les polyamines (putrescine, cadavérine, spermidine, spermine et agmatine) sont produites à partir d'acides aminés durant la fermentation (ornithine, et arginine, en ce qui concerne l'agmatine) (Okamoto et al, 1997), (Moinard et al, 2005). Elles sont retrouvées de manière ubiquitaire dans les organismes et joueraient de nombreux rôles physiologiques et physiopathologiques. Des inhibiteurs de la synthèse des polyamines auraient des intérêts cliniques comme anti-tumoraux et antiparasitaires (Patocka & Kuehn, 2000).

Les polyamines sont impliquées dans le processus inflammatoire et dans les voies de la douleur. L'agmatine est régulée par les lipopolysaccharides et les cytokines inflammatoires (Sastre et al, 1998). Les niveaux d'expression de ces molécules sont augmentés lors d'une infection, d'un traumatisme et d'un cancer (Sastre et al, 1998), (Zhang et al, 2000). Une étude a montré que l'agmatine et ses dérivés sont capables d'activer ASIC3 en condition de pH physiologique et de générer une douleur suite à l'augmentation de l'activité des neurones sensoriels (Yu et al, 2010). C'était la première fois qu'un activateur des canaux ASIC3, autre que le proton, était mis en évidence. Ultérieurement, il a été montré que l'activation par l'agmatine est fortement potentialisée en conditions d'acidose modérée, d'hyperosmolarité et par l'acide arachidonique (AA) (Li et al, 2010). Ces conditions se produisent lors de nombreux processus physiopathologiques et notamment en cas d'inflammation (Deval et al, 2008), (Steen et al, 1995c), (Yagi et al, 2006), (Vakili et al, 1970). Ainsi, l'agmatine agit de manière synergique avec des médiateurs inflammatoires et peut générer une douleur, par activation d'ASIC3.

LES MOLECULES LIPIDIQUES ISSUES DE LA DEGRADATION DE LA MEMBRANE PLASMIQUE

La lésion tissulaire engendre une dégradation de la membrane plasmique phospholipidique, ce qui génère divers médiateurs lipidiques : des lysophospholipides et des acides gras, comme l'acide arachidonique (AA) (**Figure 7 bis**). Certains de ces lipides modulent directement l'activité des nocicepteurs. L'AA, induit la synthèse des éicosanoïdes (prostaglandines et leucotriènes), via l'action de deux grandes variétés d'enzymes, les lypo-oxygénases (LOX) et les cyclo-oxygénases (COX) (**Figures 7**). Le PAF (« Platelet Activating Factor ») est également produit à partir des phospholipides membranaires. Comme son nom l'indique, il active les plaquettes, mais aussi les polynucléaires, les macrophages et les cellules endothéliales.

o Les lysophospholipides et l'acide arachidonique

Lors d'une lésion tissulaire, les phospholipides membranaires : phosphatidyl-choline (PC), -éthanolamine (PE), -sérine (PS) et -inositol (PI) sont dégradés par l'enzyme phospholipase A_2 (PLA_2) (**Figure 7 bis**). Ceci conduit à la formation d'acides gras (notamment l'AA) et de lysophospholipides (LPL): lysophosphatidyl-choline (LPC), -éthanolamine (LPE), -sérine (LPS) et -inositol (LPI). A partir de la LPC, la lysophospholipase D, ou autotaxine, forme de l'acide lysophosphatidique (LPA). Ces nombreux médiateurs inflammatoires, produits au sein du tissu lésé, modulent l'activité de certains acteurs de la nociception comme les canaux ioniques TRPV1 (Pan et al, 2010), (Nieto-Posadas et al, 2012), TRAAK, TREK (Maingret et al, 2000), (Cohen et al, 2009), (Chemin et al, 2005) et ASIC (voir partie résultats). Ils sont ainsi impliqués dans les pathologies inflammatoires et neuropathiques (Renback et al, 1999), (Renback et al, 2000), (Wallace et al, 2003), (Inoue et al, 2008a; Inoue et al, 2008b; Inoue et al, 2004; Inoue et al, 2008c; Ma et al, 2009), (Ueda, 2008; Ueda, 2011), (Ma et al, 2010; Ma et al, 2009), (Nagai et al, 2010), (Nieto-Posadas et al, 2012).

L'activité des canaux TRPV1 est régulée lors de pathologies comme les maladies inflammatoires de l'intestin (Yiangou et al, 2001a), les cancers osseux (Niiyama et al, 2007), les douleurs neuropathiques (Michael & Priestley, 1999) et inflammatoires (Amaya et al, 2003). Ce canal semble modulé par le phospholipide PIP_2 (phosphatidylinositol-bisphosphate) (Chuang et al, 2001), (Stein et al, 2006). Par ailleurs, depuis les années 1990, des preuves émergent quant au rôle du LPA, surexprimé en cas de lésion tissulaire, dans l'activation des fibres nociceptives primaires et conduisant à la douleur neuropathique (Ueda, 2011). Récemment, une étude réalisée sur des souris invalidées pour le gène codant TRPV1 a démontré l'implication de ces canaux dans la douleur aiguë induite par le LPA. Le LPA active directement le canal, sans intervention d'un récepteur couplé à une protéine G (Nieto-Posadas et al, 2012).

L'activation des canaux TRAAK et TREK par l'AA a été décrite à la fin des années 1990, par une équipe de l'institut, qui a mis en évidence leur stimulation par les déformations de la

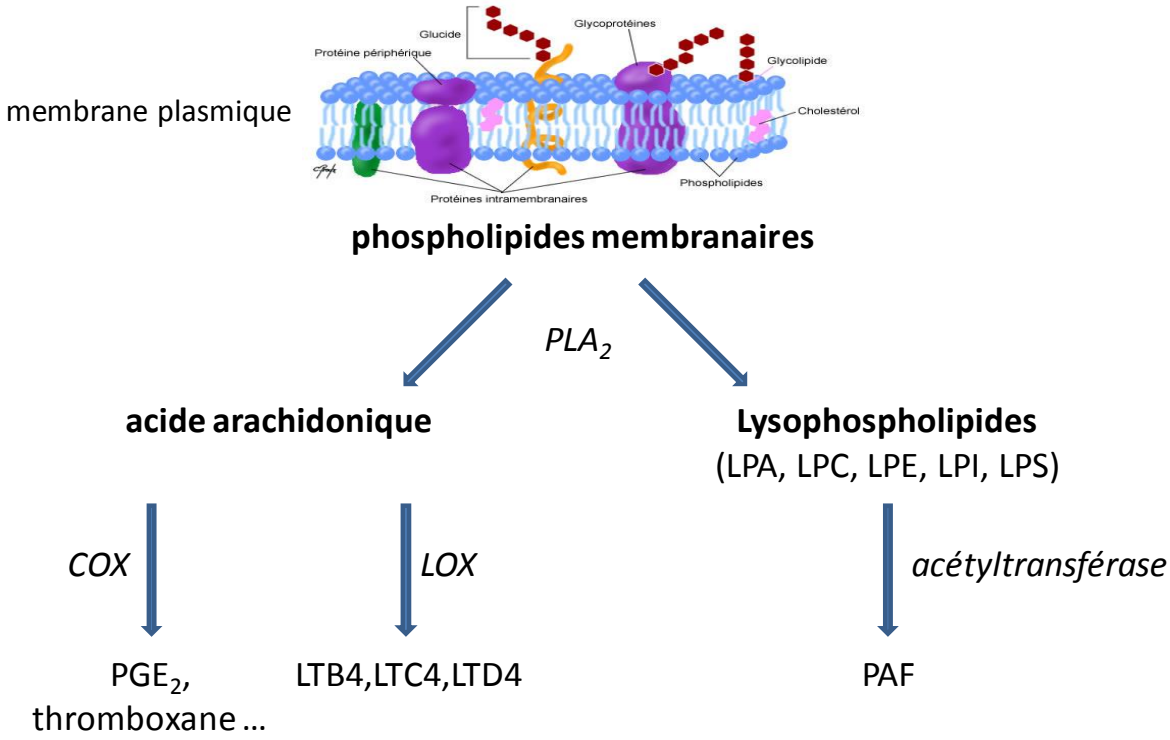


Figure 7 bis: Schéma de la synthèse des médiateurs inflammatoires lipidiques à partir de la dégradation de la membrane plasmique.

Lors d'une lésion, les phospholipides membranaires sont dégradés par action de la phospholipase A_2 (PLA_2) en acides gras (par exemple l'acide arachidonique) et lysophospholipides. Les dérivés de l'acide arachidonique, regroupés sous le terme d'éicosanoïdes, sont produits par deux types d'enzymes : les cyclooxygénases (COX) et lypooxygénases (LOX). Les COX produisent les prostaglandines, dont la prostaglandine E_2 (PGE_2) et le thromboxane. Les LOX permettent la formation des leucotriènes B4 (LTB4), C4 (LTC4) et D4 (LTD4). A partir les lysophospholipides, une acétyltransférase forme le PAF (« Platelet Activating Factor »).

membrane plasmique (Patel et al, 1998), (Patel et al, 2001). L'action des LPL sur ces canaux dépend de la taille de leur tête polaire et de la longueur de leur chaîne. Toutefois, contrairement à l'action directe de l'AA, celle de la LPC est indirecte (Maingret et al, 2000). En effet, à la différence de l'AA, cette activation est perdue en absence de l'intégrité de la cellule (patch excisé), ce qui suggère qu'un facteur cytoplasmique pourrait être impliqué.

L'AA augmente l'activité des canaux ASIC (Allen & Attwell, 2002), (Smith et al, 2007), (Deval et al, 2008), (Li et al, 2010). Cette potentialisation est directe puisque la déformation de la membrane n'entraîne pas de modification du comportement du canal, et qu'elle existe sur les canaux étudiés en patch excisé. L'effet potentialisateur de l'AA est spécifique car il est perdu lors de l'inhibition du métabolisme de l'AA (Smith et al, 2007). De plus, cet effet conduit à une hausse de l'excitabilité des neurones sensoriels en augmentant le nombre de potentiels d'action. L'AA agit principalement sur les courants ASIC3 à un pH proche du pH physiologique (pH 7,2). Les courants ASIC1a sont également potentialisés par l'AA mais de manière moins importante que les courants ASIC3. Les effets de l'AA sur ASIC3 sont dus à un décalage de la courbe d'activation du canal pour des pH moins acides. C'est-à-dire que l'AA augmente le courant de fenêtre d'ASIC3 (voir partie « Propriétés biophysiques des canaux ASIC »), ce qui conduit à une légère activation du canal au pH physiologique. De plus, l'AA agit sur les canaux ASIC3 en synergie avec l'acidose et d'autres médiateurs de l'inflammation comme l'hypertonicité (voir ci-après), pour générer une douleur cutanée chez les rats (Deval et al, 2008). Ces données suggèrent que le canal ASIC3 est un intégrateur polymodal, en particulier dans le développement de douleurs liées à l'inflammation tissulaire (Deval et al, 2008), (Li et al, 2010).

o Les leucotriènes

Les leucotriènes sont synthétisés à partir de l'AA par les enzymes lypo-oxygénases (LOX). Il existe les leucotriènes B4 (LTB4), C4 (LTB4), D4 (LTD4) et E4 (LTE4) (**Figure 7 bis**). Les leucotriènes agissent via leurs récepteurs couplés à des protéines G incluant, par exemple, les récepteurs BLT1 et BLT2 pour le LTB4 (**Figures 7**). De nombreuses études ont mis en évidence que les produits des LOX génèrent une nociception. Par exemple, l'administration de LTB4 dans la patte de rat réduit le seuil de vocalisation induit par une pression mécanique (Rackham & Ford-Hutchinson, 1983). Le LTC4 produit une dépolarisation de la membrane des neurones du ganglion noueux de cochon d'inde (Undem & Weinreich, 1993). De plus, l'utilisation d'un inhibiteur non sélectif des LOX réduit la douleur inflammatoire et les décharges de potentiels d'action dans les fibres sensorielles (Shin et al, 2002), (Petho & Reeh, 2012). De même, le traitement intraplantaire avec cet inhibiteur diminue l'hyperalgie au chaud chez les rats (Furedi et al, 2010). Ces résultats laissent penser que l'inhibition des LOX bloque les courants Na_v dans les neurones de DRG de rat (Kim et al, 2006). De surcroît, de nombreux produits des LOX, comme LTB4, pourraient activer directement les canaux TRPV1 (Kim et al, 2004), (Nicolson et al, 2002).

o Les prostanoïdes : prostaglandines et thromboxanes

Au cours d'une inflammation, la dégradation de la membrane lipidique conduit à la formation de prostanoïdes, produits par les cyclo-oxygénases (COX), à partir de l'AA (**Figure 7 bis**). Les prostanoïdes regroupent les prostaglandines et les thromboxanes. Les principales prostaglandines sont la prostaglandine E_2 (PGE_2) et la prostaglandine I_2 (PGI_2). Le niveau d'expression de la PGE_2 augmente dans les conditions inflammatoires et la PGE_2 est à l'origine des principaux symptômes de l'inflammation (les quatre « or » : œdème, douleur, chaleur et rougeur). Suite à une lésion tissulaire, la PGE_2, via ses récepteurs (EP), sensibilise les nocicepteurs périphériques (Omote et al, 2002). Cette sensibilisation, définie par une réduction du seuil nociceptif et par une augmentation de l'activité périphérique des neurones afférents, constitue la caractéristique principale de l'hyperalgie inflammatoire dans les tissus périphériques. Ceci explique l'utilisation généralisée des inhibiteurs des COX périphériques, qui empêchent la synthèse des PGE_2 et réduisent les hyperalgies inflammatoires (Smith & Willis, 1971), (Vane, 1971) (voir chapitre traitements de la douleur, anti-inflammatoires non stéroïdiens). Il existe trois types de COX (COX-1, COX-2 et COX-3). La COX-1 est constitutive. Elle assure en permanence des fonctions physiologiques variées telles que l'agrégation plaquettaire, la protection de la muqueuse gastro-intestinale, la régulation du flux sanguin rénal… La COX-2, au contraire, est inductible. Son expression est fortement augmentée dans les neurones de DRG au cours de l'inflammation périphérique, suggérant que cette isoforme est particulièrement importante pour l'hyperalgie (Amaya et al, 2009). Les rôles de la COX-3, retrouvée dans certaines espèces, sont, en revanche, peu documentés à l'heure actuelle (Chandrasekharan et al, 2002).

Les PGE_2 et PGI_2, via leurs récepteurs respectifs EP et IP, modulent l'activité de divers canaux ioniques, conduisant à un effet pro-nociceptif (Petho & Reeh, 2012). Elles potentialisent les canaux TRPV1 activés par le chaud, la capsaïcine ou les protons (Lopshire & Nicol, 1997), (Lopshire & Nicol, 1998), via principalement la voie de la PKC (Moriyama et al, 2005). La PGE_2 inhibe les canaux TREK-1, exprimés sur les neurones sensoriels où ils sont co-localisés avec TRPV1 (Alloui et al, 2006), ce qui faciliterait la dépolarisation des terminaisons nerveuses nociceptives (Alloui et al, 2006). Elle réduirait également le seuil de déclenchement des potentiels d'action par action inhibitrice sur les courants potassiques dépendant du voltage (K_v) (Petho & Reeh, 2012).

Les thromboxanes majeurs sont les thromboxanes A_2 et B_2. Ils activent l'agrégation des plaquettes et participent ainsi à la coagulation sanguine.

o Le PAF

Le PAF est produit à partir des phospholipides membranaires, par la phospholipase A_2 (PLA_2) (**Figure 7 bis**). Celle-ci hydrolyse des phospholipides en lysoPAF et AA. Le lysoPAF, précurseur inactif, est acétylé, pour former le PAF. Le PAF agit via ses récepteurs spécifiques couplés à des protéines G et conduit à l'activation des voies IP_3-Ca^{2+}-PKC et PKA-AMPc.

L'injection intraplantaire de PAF chez le rat induit un comportement douloureux aigu qui implique une interleukine, TRPV1 et la dégranulation des mastocytes (Petho & Reeh, 2012). L'injection intradermique d'un agoniste stable du PAF dans la patte de souris provoque une hyperalgie mécanique mais pas thermique (Zhang et al, 2009). Enfin, l'injection de PAF dans la peau de volontaires humains a également montré l'induction d'une hyperalgie mécanique (Basran et al, 1984). Le PAF augmenterait l'expression des récepteurs à la bradykinine dans la peau de rat (Fernandes et al, 2003). L'ensemble de ces résultats montre que le récepteur du PAF n'est pas impliqué dans la réponse mécanique et thermique dans les conditions basales mais que son activation joue un rôle dans l'hyperalgie mécanique inflammatoire et neuropathique.

L'HYPERTONICITE

Nous venons de voir que lors d'une inflammation ou d'une lésion tissulaire, de nombreux médiateurs sont produits et sécrétés dans le liquide interstitiel (Steen et al, 1995c). Ils constituent un exsudat acide et hyperosmotique (Vakili et al, 1970) de l'ordre de 600 mosm/l (Schwartz et al, 2009).

Dans ce contexte, mon laboratoire de thèse à souhaité étudier les effets de l'hypertonicité sur les canaux ASIC, impliqués dans les douleurs consécutives à l'inflammation. Notre équipe a montré que l'hyperosmolarité (effet maximum pour 600 mosm/l) accroît fortement les courants ASIC induits par une acidité modérée (pH 7,4 à 7,0) augmentant ainsi l'excitabilité des neurones sensoriels (Deval et al, 2008). Cette potentialisation des courants générés par l'acidification est spécifique des canaux ASIC3 puisque, dans les mêmes conditions, les courants ASIC1a ne sont pas modulés. Par contre, pour des courants induits par des pH plus acides (pH 7,4 à 6,6), l'hyperosmolarité n'a plus d'effet sur l'activité des canaux ASIC3. Cela documente l'effet potentialisateur de l'hyperosmolarité sur les canaux ASIC3, dans une gamme de pH modéré (Deval et al, 2008), (Li et al, 2010), et démontre une action sur le courant de fenêtre spécifique d'ASIC3, impliqué dans des douleurs ischémiques cardiaques (Yagi et al, 2006).

Pour résumer ce qui a été démontré, rappelons que l'hypertonicité, l'acidité et l'acide arachidonique, ont une action synergique sur les canaux ASIC3. Ils augmentent l'excitabilité des neurones sensoriels et génèrent une douleur cutanée chez les rats (Deval et al, 2008). Le canal ASIC3 a donc un rôle important dans la détection des signaux présents en condition inflammatoire et contribue à la douleur inflammatoire (Li et al, 2010).

Les interactions entre les nocicepteurs et les différents agents pro-algiques ou pro-inflammatoires que nous venons de voir augmentent l'excitabilité de la fibre nerveuse. Celle-ci devient alors hypersensible aux diverses stimulations qui l'entourent (comme la température ou le toucher, par exemple). Cette sensibilisation périphérique conduit à des réponses sensorielles exacerbées, qui engendrent des douleurs chroniques.

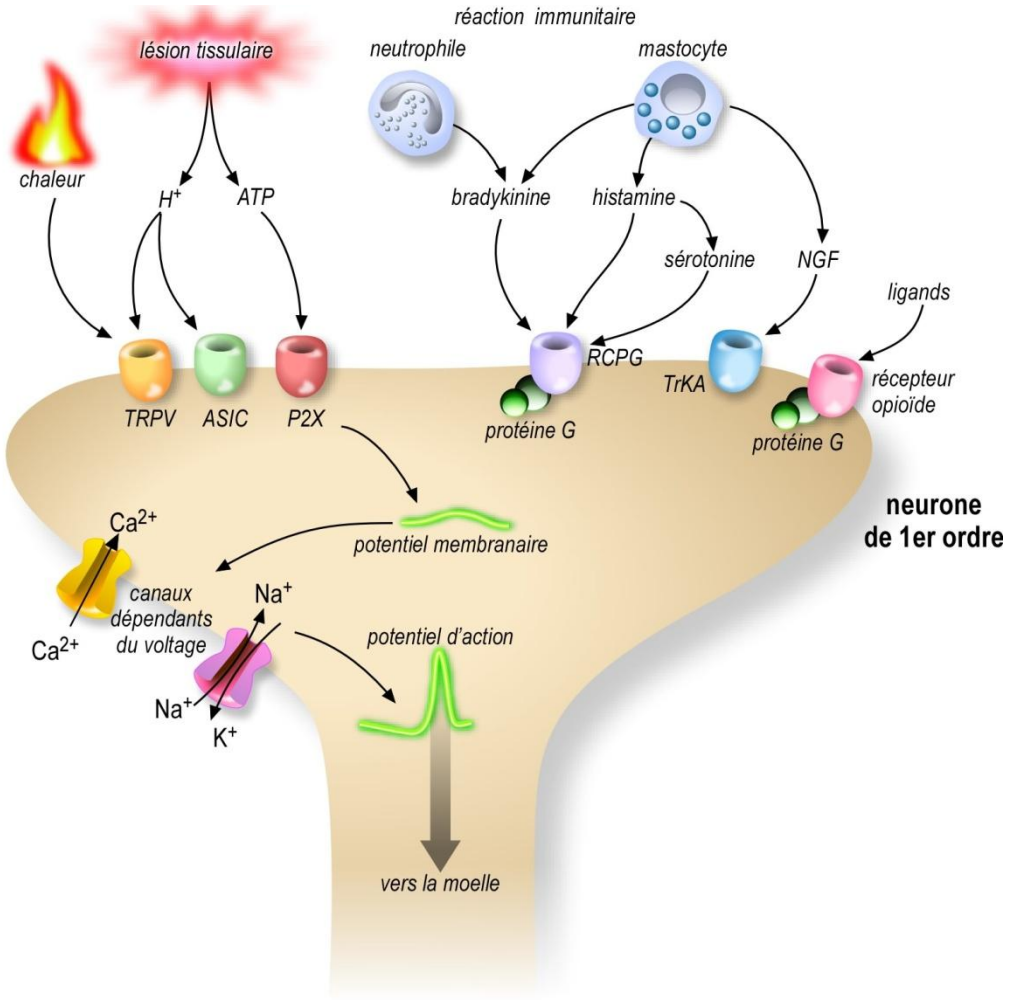


Figure 8 : Eléments algogènes et inflammatoires à l'origine du déclenchement du signal nociceptif.

Suite à une stimulation thermique ou mécanique ou suite à une lésion tissulaire de nombreux signaux nociceptifs ou inflammatoires sont libérés aux alentours de la zone affectée par les cellules lésées ou par les cellules participant au processus inflammatoire. La lésion génère notamment de la chaleur, des protons, de l'ATP, qui activent respectivement les canaux ioniques TRPV, ASIC et P2X à l'extrémité du nocicepteur. Les cellules du système immunitaire produisent de la bradykinine, de l'histamine, du NGF, de la sérotonine, qui se fixent à leurs récepteurs propres, couplés à des protéines G. L'activation de ces différentes voies modifie la polarisation de la membrane du nocicepteur, stimule les canaux dépendant du voltage et génère des potentiels d'action. Le signal nociceptif à la périphérie est ainsi transformé en influx électrique puis conduit par les fibres primaires Aδ et C jusqu'à la corne dorsale de la moelle épinière.

(TRPV : « Transient Receptor Potential Vanilloid » ; ASIC : « Acid Sensing Ionic Channels » ; P2X : récepteur purinergique ; RCPG : récepteur aux protéines G ; TrkA : récepteur à activité tyrosine kinase A).

✓ LES ACTEURS DE LA PROPAGATION DU SIGNAL NOCICEPTIF

Les signaux de nature thermique, mécanique ou chimique, sont transmis par les terminaisons afférentes primaires, suite à l'activation des canaux sodiques, calciques et potassiques dépendant du voltage, qui vont générer ou moduler les potentiels d'action. Parmi ces canaux activés par les modifications du potentiel de membrane du neurone, nous allons plus particulièrement nous intéresser aux canaux sodiques spécifiques du système nerveux périphérique puisque leur rôle est primordial pour l'excitation du neurone sensoriel et la transmission du message douloureux en provenance des tissus périphériques. Ces canaux, appelés Na_v, sont activés par la dépolarisation membranaire et sont impliqués dans la génération des potentiels d'action à l'origine de l'excitabilité neuronale. En revanche, les canaux potassiques dépendant du voltage (K_v), modulent négativement cette excitabilité par leur effet hyperpolarisant. Enfin, les canaux calciques régulés par le voltage (Ca_v) sont impliqués, à la fois, dans l'élaboration du potentiel d'action et dans le développement des réponses physiologiques en aval, telles que la libération des neurotransmetteurs et l'expression dépendante du calcium de certains gènes.

LES CANAUX SODIQUES DEPENDANT DU VOLTAGE

Les canaux sodiques dépendant du voltage (Na_v), sont exprimés dans tout le règne animal et constituent des éléments vitaux pour le bon fonctionnement de la plupart des cellules excitables. Ils sont pour cette raison d'intéressantes cibles pharmacologiques et médicamenteuses, dans de nombreuses pathologies telles que les arythmies cardiaques, l'épilepsie et les douleurs chroniques. Ils sont aussi utilisés comme anesthésiques (Docherty & Farmer, 2009). Toutefois, les différents sous-types de Na_v ont des rôles variés selon leurs propriétés et leur distribution tissulaire. Nous allons ici nous intéresser plus particulièrement aux canaux Na_v exprimés au niveau des neurones sensoriels des tissus périphériques, les canaux Na_v 1.7, Na_v 1.8 et Na_v 1.9. Les scientifiques espèrent trouver des bloqueurs sélectifs de ces Na_v qui formeraient de nouveaux analgésiques puissants pour le traitement d'une grande variété de pathologies sensorielles comme la douleur chronique par exemple.

Les canaux Na_v 1.7 sont impliqués dans plusieurs pathologies douloureuses chez l'Homme (Drenth & Waxman, 2007). Des mutations gain de fonction de Na_v 1.7 conduisent à des douleurs spontanées comme l'érythromyalgie ou le syndrome de douleur extrême paroxystique (Dib-Hajj et al, 2008), (Drenth & Waxman, 2007). De rares mutations perte de fonction conduisent à une insensibilité congénitale à la douleur (Cox et al, 2006). Des études sur les animaux dépourvus de Na_v 1.7 au niveau des nocicepteurs ont montré un rôle primordial de ce canal dans l'induction de la douleur inflammatoire, mécanique et thermique (Nassar et al, 2004), mais pas dans le développement de la douleur neuropathique (Nassar et al, 2005).

Les canaux Na_v 1.8 sont essentiellement exprimés dans les nocicepteurs (Dib-Hajj et al, 2010), où ils contribuent au courant sodique qui sous-tend la phase de dépolarisation du

potentiel d'action (PA). Des travaux ont montré qu'ils sont essentiels dans la perception de la douleur au froid (Zimmermann et al, 2007). Les souris porteuses du gène Na_v 1.8 invalidé présentent des déficits de la propagation du PA et de l'hypersensibilité mécanique (Roza et al, 2003). Ces canaux sont également impliqués dans les douleurs neuropathiques (Lai et al, 2002), (Joshi et al, 2006), (Jarvis et al, 2007) et inflammatoires (Jarvis et al, 2007), (Akopian et al, 1999). Ils sont régulés par des médiateurs de l'inflammation comme la PGE_2 (Akopian et al, 1999), qui modulerait leur activité dans les afférences du côlon et serait à l'origine de douleurs viscérales dans certaines pathologies inflammatoires intestinales (Gold et al, 2002).

Les canaux Na_v 1.9 permettent l'initiation et la propagation des PA dans les neurones sensoriels. Ils contribuent amplement à l'excitabilité des afférences nociceptives et forment ainsi des cibles pour les médicaments analgésiques (Wood et al, 2004). Des modèles de rongeurs dépourvus de ces canaux ont permis de mettre en évidence leur rôle dans l'hypersensibilité des nocicepteurs en conditions inflammatoires (Priest et al, 2005), (Maingret et al, 2008), (Lolignier et al, 2011).

LES CANAUX POTASSIQUES DEPENDANT DU VOLTAGE

Les canaux potassiques (K_v) sont d'importants régulateurs physiologiques des potentiels de membrane et modulent ainsi le potentiel d'action des cellules excitables. Ils sont présents notamment dans les neurones sensoriels de DRG et dans les neurones des ganglions trijumeaux (TG) (Takeda et al, 2011). Leur ouverture conduit à une hyperpolarisation membranaire résultant en une réduction de l'excitabilité neuronale. Plusieurs études montrent que les lésions nerveuses périphériques et l'inflammation réduisent de manière importante l'expression des canaux K_v dans les neurones sensoriels (Everill & Kocsis, 1999), (Kim et al, 2002), (Park et al, 2003), (Takeda et al, 2006). Ces canaux pourraient être des cibles pour le traitement des douleurs (Lawson & Dunne, 2001), (Sarantopoulos et al, 2007), (Kawano et al, 2009).

LES CANAUX CALCIQUES DEPENDANT DU VOLTAGE

Les canaux calciques dépendant du voltage (Ca_v) sont impliqués dans l'excitabilité des neurones sensoriels, la transmission du signal nociceptif au niveau de la moelle et la sensibilisation centrale. Exprimés de manière assez ubiquitaire, certains sont présents au niveau des terminaisons nerveuses périphériques et au niveau des terminaisons pré-synaptiques des neurones spinaux. Différents types de canaux Ca_v, notamment les Ca_v3.2, ont été associés aux douleurs inflammatoires, neuropathiques (Catterall et al, 2003), (Bourinet et al, 2005), (Dogrul et al, 2003), (Todorovic et al, 2004) et à un certain type de migraine familiale (Ophoff et al, 1996), (Pietrobon, 2007). Des inhibiteurs de ces canaux pourraient être utilisés pour lutter contre ces douleurs. Mais, l'expression de ces canaux dans de nombreux tissus, tels que le cœur, le muscle lisse, les reins, restreint l'utilisation de telles drogues. Le ziconotide, comme nous le verrons plus tard, est un analogue synthétique

d'une toxine de cône marin qui inhibe les canaux $Ca_v2.2$. Il est actuellement utilisé en clinique pour réduire les fortes douleurs de fin de vie comme les douleurs cancéreuses ou celles causées par le SIDA (Malmberg & Yaksh, 1995), (Staats et al, 2004).

b. LA TRANSMISSION DU MESSAGE DOULOUREUX JUSQU'AU CERVEAU VIA LA MOELLE EPINIERE

La transmission au cerveau des stimuli provenant de la périphérie se fait par l'intermédiaire de la moelle épinière (**Figure 9**).

La corne dorsale de la moelle épinière contient différents types cellulaires neuronaux connectés avec les afférences primaires. Parmi ces neurones sensoriels de second ordre, on trouve des neurones qui sont, soit nociceptifs, soit WDR (*« Wide Dynamic Range »*) (D'Mello & Dickenson, 2008). Les premiers types de neurones reçoivent des informations en provenance des afférences nociceptives (fibres C et Aδ), alors que les neurones WDR reçoivent des contributions des trois types de fibres sensorielles primaires (Aβ, Aδ et C). Les neurones WDR répondent ainsi à une gamme complète de stimulation, allant du toucher fin aux stimuli nocifs (Basbaum et al, 2009). Les neurones WDR répondent de manière graduelle en fonction de l'intensité du stimulus et possèdent une certaine plasticité qui est à l'origine du mécanisme de sensibilisation centrale appelé « wind up » (Treede et al, 1992).

L'information sensorielle primaire est ensuite acheminée au cerveau, principalement au niveau du thalamus, via les voies ascendantes spino-thalamiques. A partir du thalamus, l'information nociceptive est transmise aux régions corticales regroupées sous le terme de « matrice de la douleur » (cortex préfrontal, cingulaire antérieur, insulaire et somatosensoriel).

Le cerveau contrôle un réseau complexe, capable de moduler l'activité entrante des fibres afférentes primaires. Certains mécanismes contribuent ainsi à l'inhibition des signaux douloureux en provenance de la périphérie. Ils sont portés par les voies descendantes dans le funiculi dorso-latéral. Le système opioïde a un rôle majeur dans la suppression de la douleur dans l'organisme. Les récepteurs aux opioïdes (μ, δ et κ) sont présents à tous les niveaux, dans les afférences primaires, dans la moelle épinière et dans le cerveau (Pinto et al, 2008). L'activation des récepteurs aux opioïdes génère une inhibition des canaux calciques dépendant du voltage, ce qui bloque la libération des neurotransmetteurs douloureux par les fibres nociceptives et résulte en une analgésie (Trescot et al, 2008).

Au niveau des sites post-synaptiques, les opioïdes permettent l'ouverture des canaux potassiques et réduisent ainsi l'excitabilité des cellules nerveuses (Dickenson, 1995). Les opioïdes ont des effets complexes au niveau du cerveau, où ils stimulent l'inhibition descendante. Les voies descendantes libèrent de la noradrénaline et de la sérotonine, qui conduisent à la modulation du signal douloureux au niveau de la moelle (Pertovaara, 2006).

Les cannabinoïdes endogènes (récepteurs CB1 et CB2), présents aux niveaux supraspinal, spinal et périphérique, peuvent également participer à la suppression du processus nociceptif (McLaughlin & Abood, 1993), (Olesen et al, 2012), (Amaya, 2007), (Guerrero et al, 2008).

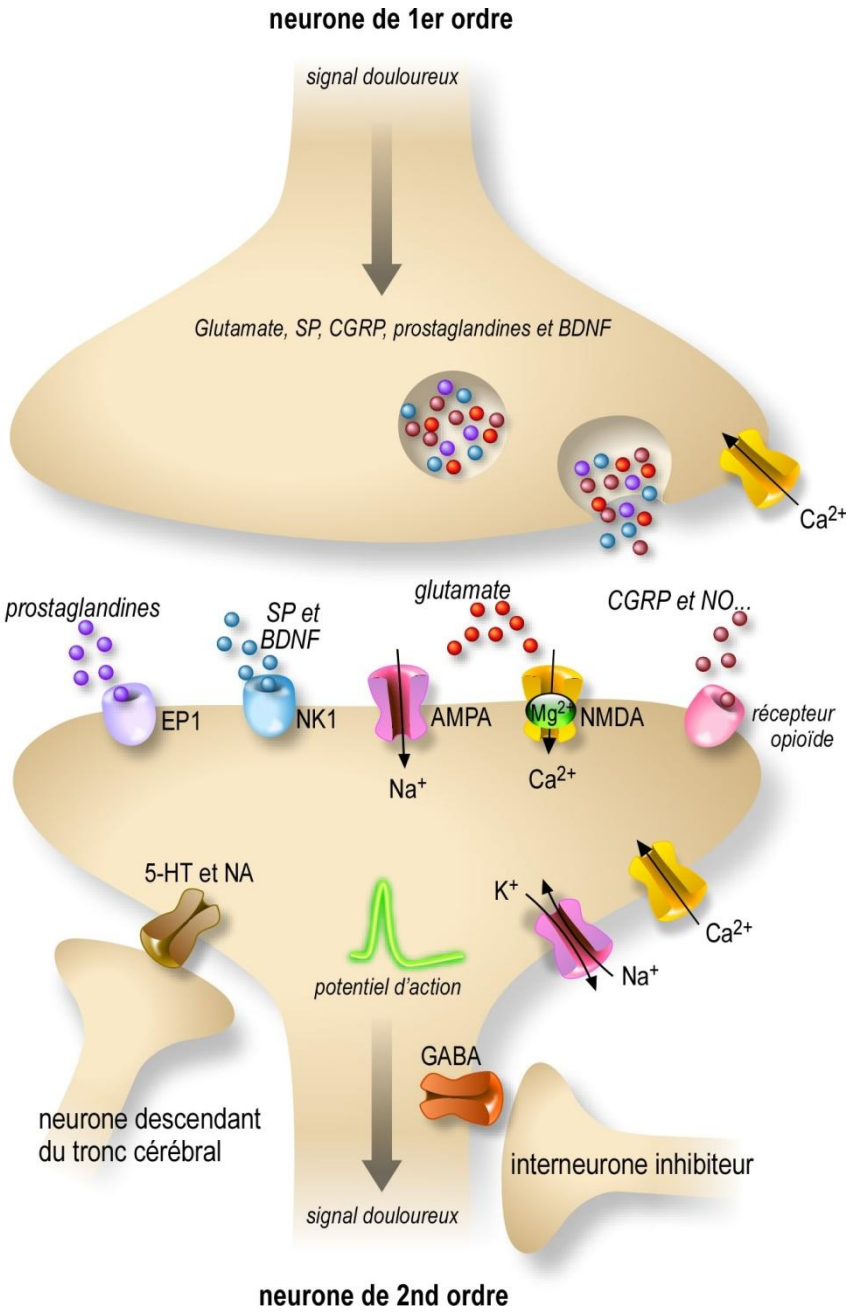


Figure 9 : La transmission du message nociceptif vers les neurones au niveau spinal.

Le signal nociceptif est transformé en influx électrique (potentiels d'action) grâce aux canaux sodiques dépendant du voltage activés suite à l'activation de canaux ioniques dépolarisants. Cet influx active les canaux calciques sensibles au voltage, conduisant en une entrée de Ca^{2+}. Cet influx de Ca^{2+} entraîne la fusion des vésicules synaptiques et va ainsi permettre la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Les neurotransmetteurs de différentes natures se fixent sur leurs récepteurs post-synaptiques et le signal nociceptif est transmis aux centres supérieurs intégrateurs par le tractus spino-thalamique.

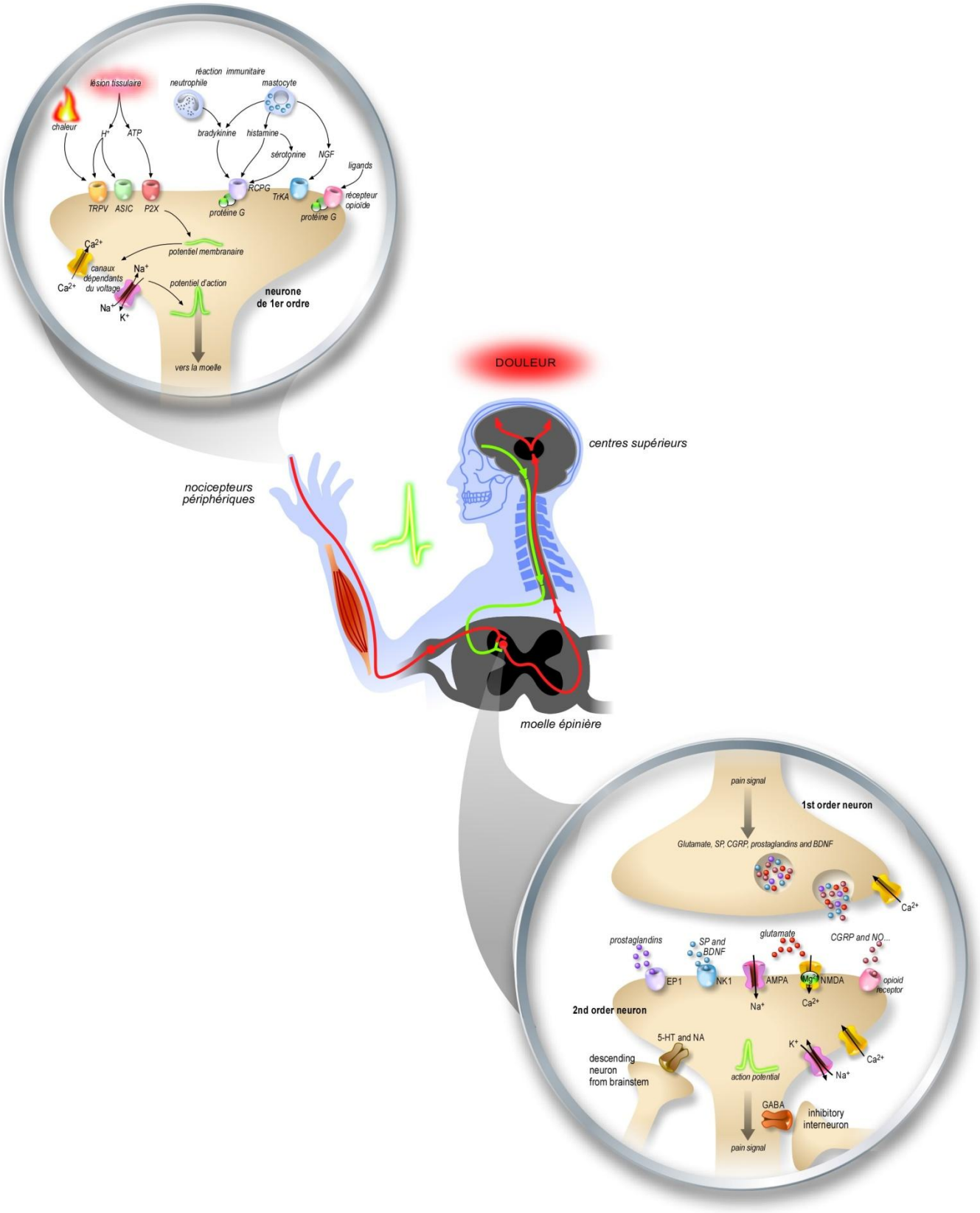


Figure 10 : Schéma récapitulatif des voies de la perception et de la transmission de la douleur.

Les signaux douloureux en provenance de l'environnement, d'ordre chimique, mécanique ou thermique, sont perçus par les neurones sensoriels périphériques qui innervent les organes externes, comme la peau (schéma en haut à gauche), ou les organes internes, comme les muscles ou les viscères par exemple. Afin de signaler et faire prendre conscience à l'organisme du danger, les différents signaux détectés par les organes doivent être conduits aux centres supérieurs afin d'élaborer une stratégie de réponse dans le but de protéger l'intégrité de l'organisme. Ainsi, les afférences nerveuses périphériques traduisent ces divers influx chimique, thermique ou mécanique, en message électrique (schéma en bas à gauche). Celui-ci est transmis à la moelle épinière, où les neurones de la racine dorsale sont activés (schéma en bas à droite) et transmettent à leur tour l'influx aux centres supérieurs de l'encéphale. A ce niveau, les signaux électriques sont traduits en message douloureux conscient. Des informations peuvent alors redescendre via les voies descendantes afin de moduler et contrôler la douleur perçue.

La perception et l'intégration des messages douloureux peuvent être modulées de différentes manières, dans différentes structures et à différents moments. Cela conduit à une perception personnelle, subjective et modulable de la douleur. Toutefois, la douleur, lorsqu'elle a un caractère nociceptif est utile et participe à la préservation de l'intégrité de l'organisme. Cependant, lorsque « le système s'emballe » et que cette douleur devient incontrôlable, permanente et/ou insupportable, il convient d'essayer de la traiter ou de la réduire. Nous allons voir maintenant quelques-uns des traitements médicamenteux analgésiques les plus utilisés en clinique, ainsi que certaines pratiques non médicamenteuses, souvent ancestrales.

3. TRAITEMENTS DE LA DOULEUR

Il existe différents types de traitements selon l'intensité des douleurs. Nous ferons rapidement le tour des médicaments utilisés à ce jour, et nous aborderons brièvement les remèdes qui ne font pas appel à la pharmacologie.

a. LES TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES

Les traitements pharmacologiques visent à réduire les douleurs, sans provoquer de perte de conscience. Trois grands moyens permettent de diminuer la douleur : l'inhibition de la production des substances algogènes, l'inhibition des mécanismes de déclenchement et/ou de propagation du signal nociceptif, l'augmentation des contrôles inhibiteurs descendants au niveau central.

Les médicaments antalgiques sont utilisés pour atténuer les « petites douleurs » ou les migraines. Ils sont constitués essentiellement du paracétamol, de l'aspirine et des anti-inflammatoires non stéroïdiens. Les médicaments analgésiques sont destinés à éliminer les douleurs plus fortes, chroniques ou post-opératoires, par exemple. Ils regroupent les opiacés faibles, comme le dextroproxyphène et le tramadol, et les opiacés forts, comme la morphine. Certains définissent même ces deux types de médicaments selon leur niveau d'action, périphérique ou central. Toutefois, comme nous allons le voir, il est difficile de dissocier les molécules en fonction de leur mode d'action, puisque de nouveaux mécanismes sont régulièrement découverts.

✓ LES ANTALGIQUES : LE PARACETAMOL, L'ASPIRINE ET LES ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROIDIENS

LE PARACETAMOL

Le paracétamol ou acétaminophène est utilisé pour traiter des douleurs de faible intensité (antalgique) ainsi que la fièvre (antipyrétique). C'est le médicament le plus prescrit en France car il comporte peu de contre-indication, possède peu d'effets indésirables importants lorsque la posologie est respectée, et peut être prescrit à tout âge.

o Origine

C'est un chimiste américain, Harmon Northrop Morse, qui synthétisa le paracétamol ou acétylaminophénol en 1878. Mais à cette époque, les propriétés antalgiques de cette molécule ne sont pas encore connues et l'aspirine, ou acide acétylsalicylique est largement utilisée pour réduire les douleurs. C'est quand les premiers effets secondaires de l'aspirine

commencent à être mis en évidence, qu'une providentielle erreur de manipulation de l'équipe du professeur Adolf Kussmaul va révéler les effets antipyrétiques et antalgiques de l'acétanilide, un précurseur du paracétamol. Puis, des conclusions erronées de Joseph von Mering en 1893, quant à la toxicité rénale de cette molécule, conduisent à son abandon pendant plus d'un demi-siècle. Ce n'est qu'en 1948, que Bernard Brodie et Julius Axelrod démontrent que l'acétanilide est dégradée dans l'organisme et que seul le paracétamol a des actions sur la douleur et la fièvre (Brodie & Axelrod, 1948).

Les effets remarquables du paracétamol, dépourvus des effets indésirables de l'aspirine, font alors sa grande popularité à travers le monde.

o Mécanismes d'action

L'action anti-nociceptive du paracétamol ou acétaminophène, après un siècle d'utilisation dans le traitement de nombreuses douleurs modérées, reste mal comprise. Toutefois trois principales actions du paracétamol ont été décrites :

- L'hypothèse de l'inhibition des cyclo-oxygénases ((Warner et al, 2004), (Warner et al, 2004), (Chandrasekharan, 2002), (Ouellet & Percival, 2001), (Boutaud et al, 2002), (Lucas et al, 2005)) (**Figure 11**)
- L'action centrale via un mécanisme sérotoninergique ((Pini et al, 1996), (Tjolsen et al, 1991), (Bonnefont et al, 2003)) (**Figure 11**)
- L'activation des récepteurs aux cannabinoïdes ((Fox & Bevan, 2005), (Fox et al, 2001), (Palazzos et al, 2006), (Hogestatt et al, 2005), (Mallet et al, 2008), (Bonnefont et al, 2007))

o Les effets indésirables

Les effets secondaires les plus fréquents du paracétamol sont des réactions allergiques cutanées, interdisant toute utilisation ultérieure du médicament. Les effets sur le tractus gastro-intestinal restent limités puisque son action est assez spécifique des COX présentes au niveau du système nerveux central. Enfin, des effets secondaires peuvent exister au niveau hépatique ou rénal, en cas de surdosage. Le paracétamol est caractérisé par une très bonne tolérance et de rares effets indésirables aux doses thérapeutiques. Cela en fait un antalgique très largement utilisé, et prescriptible chez l'enfant.

L'ASPIRINE ET LES ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROIDIENS

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont intéressants de par leurs divers effets, anti-inflammatoires, antalgiques, antipyrétiques et antithrombotiques, et certains auraient même des propriétés anticancéreuses (Mc Neil, 2013).

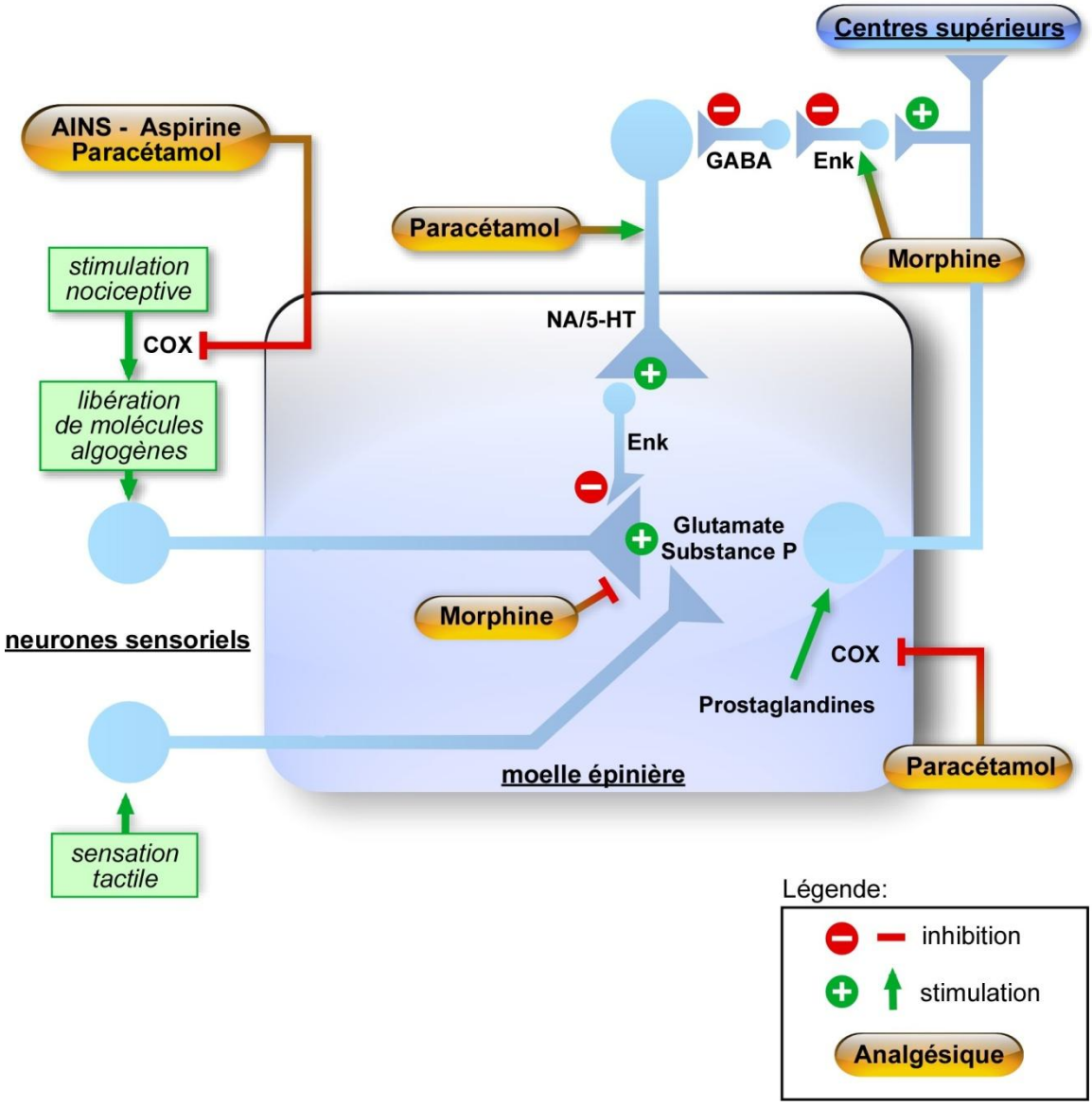


Figure 11 : Schéma des mécanismes d'action de différents analgésiques.

L'inhibition de la douleur se fait via trois mécanismes principaux : l'inhibition de la production de substances algogènes, l'inhibition du déclenchement et/ou de la propagation du signal nociceptif, et le contrôle des afférences douloureuses au niveau central. Les AINS, l'aspirine et le paracétamol inhibent les COX, empêchant la libération de molécules algogènes au niveau périphérique. Le signal nociceptif est ainsi bloqué. Le paracétamol inhibe également les COX au niveau central et active les voies sérotoninergiques descendantes, réduisant le message douloureux. La morphine agit au niveau central et au niveau périphérique, où elle active les voies des opioïdes endogènes, générant une réduction de la douleur.
(COX : cyclo-oxygénase ; NA : noradrénaline ; 5-HT : sérotonine ; Enk : enképhalines ; AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens)

o Origine

La pharmacopée égyptienne et Hippocrate utilisaient déjà les feuilles de myrte et l'écorce de saule à des fins antalgiques et antipyrétiques. Il s'avère que ces végétaux contiennent en fait de l'acide salicylique. Mais ce n'est qu'en 1897, que Felix Hoffmann synthétise ce premier AINS, qu'il appelle aspirine (Kaiser, 2008). Cette nouvelle molécule est commercialisée par Bayer (Kaiser, 2008).

o Mécanismes d'action

En 1971, Vane est le premier à proposer que l'antalgie causée par les AINS serait due à l'inhibition de la synthèse des prostaglandines (Vane, 1971). Nous savons maintenant que les AINS agissent principalement par un effet inhibiteur des COX-1 et COX-2 (Ballou et al, 2000) (**Figure 11**). L'inhibition des prostaglandines, essentiellement la $PGE_{2,}$ réduit ainsi le processus inflammatoire. Toutefois, de « nouveaux AINS », comme le célécoxib, sont développés pour inhiber spécifiquement la COX-2, induite lors de l'inflammation. Ces molécules possèdent moins d'effets secondaires, notamment gastro-intestinaux, liés à la COX-1 (présente de manière constitutive dans les plaquettes, l'épithélium gastro-intestinal, le rein…) (Fort, 1999). L'aspirine, contrairement aux autres AINS, a un effet inhibiteur irréversible des COX-1 et COX-2 (Wallace et al, 2000). Cela lui confère un rôle antalgique prolongé dans le temps et un effet antiagrégant plaquettaire. Dans un modèle de douleur thermique, les AINS ne réduisent pas les seuils de douleur mais évitent l'exacerbation de la douleur suite à une lésion tissulaire ou une inflammation (Dogrul et al, 2007).

Il existe également une autre hypothèse quant au mécanisme d'action des AINS. Il s'agit de l'action centrale sur le système opioïde endogène et sérotoninergique. En adéquation directe avec ce qui se passe en clinique, il a été mis en évidence l'existence d'une interaction synergique entre les AINS et les opioïdes (Kolesnikov et al, 2003), (Zelcer et al, 2005). En effet, l'injection intrathécale (injection dans l'espace sous-arachnoïdien, permettant un effet central au niveau de la moelle épinière et du liquide céphalo-rachidien) d'AINS est toujours plus efficace que l'injection systémique (effet périphérique) (Miranda et al, 2001). De plus, l'inhibition de la synthèse de sérotonine induit une diminution de l'activité antalgique des AINS dans différents types de douleurs (Miranda et al, 2003).

Par ailleurs, il a été montré que de fortes doses d'aspirine inhibent les canaux ASIC (Voilley et al, 2001), pouvant faire de cette molécule un agent neuroprotecteur lors d'ischémie par exemple (Wang et al, 2012).

o Les effets indésirables

L'aspirine et les AINS ont de nombreux effets secondaires liés à leur mécanisme d'action sur les deux types de COX. En effet, la COX-1 est présente dans de nombreux tissus tels que les muqueuses digestives, les plaquettes sanguines et les reins. Ainsi, son inhibition

provoque des troubles digestifs, des ulcères, des hémorragies et des complications rénales qui peuvent conduire à une insuffisance rénale. Face à ces effets indésirables qui justifient l'arrêt du traitement, l'industrie pharmaceutique essaie de développer des inhibiteurs spécifiques des COX-2.

✓ LES ANALGESIQUES OPIOÏDES : LA MORPHINE ET SES DERIVES

Les analgésiques opioïdes sont utilisés pour traiter les douleurs intenses ou chroniques. Ils sont classés en deux catégories, les opioïdes faibles et les opioïdes forts. La morphine est l'opioïde fort de référence. Elle permet de réduire les douleurs réfractaires aux autres traitements médicamenteux.

ORIGINE

Dès l'Antiquité, les écorces de quinquina (*Cinchona officinalis*) et le suc de pavot *(Papaver somniferum)* étaient utilisés pour soulager les douleurs et la fièvre (Kaiser, 2008). Le suc de pavot, ou opium, déjà prescrit par Hippocrate, a été très prisé durant des siècles. Il a même généré de grandes dépendances et toxicomanies. Ces préparations ancestrales contenaient en fait des alcaloïdes (quinine pour le quinquina et morphine pour le suc de pavot). Mais il faudra attendre les années 1805, pour que le jeune pharmacien Friedrich Wilhelm Sertürner isole pour la première fois la substance active de l'opium, la morphine. C'est le premier alcaloïde végétal isolé. Son découvreur lui donna le nom de *morphium* en raison de son effet narcotique qui lui rappelait le pouvoir de Morphée, divinité grecque du sommeil.

Les effets analgésiques très puissants de la morphine et de ses dérivés sont bien connus de nos jours. Ils sont très utiles dans la pratique clinique pour réduire les douleurs intenses ou persistantes de pathologies graves comme certains cancers par exemple.

MECANISMES D'ACTION

Les analgésiques opioïdes miment les opioïdes endogènes (endorphines, enképhalines, et dynorphines) en se fixant et activant leurs récepteurs (récepteurs μ, δ et κ, respectivement) (Trescot et al, 2008), (Pasternak, 2012). Ces récepteurs sont localisés principalement dans les régions du système nerveux central impliquées dans la transmission et la modulation du message douloureux (corne postérieure de la moelle, régions sous-corticales et tronc cérébral) (Pinto et al, 2008), et dans le système nerveux périphérique, notamment au niveau des neurones sensoriels (Takeda et al, 2004), (Stein & Zollner, 2009) (**Figure 11**). L'activation de ces récepteurs, couplés à une protéine G, entrave l'ouverture des canaux calciques et potentialise l'activité des canaux potassiques dépendant du voltage. Il s'ensuit une réduction de la libération de neurotransmetteurs et une hyperpolarisation

affaiblissant la transmission du message douloureux. Bien que la plupart des effets connus des opioïdes soient centraux (notamment les effets indésirables), il a été montré qu'un analogue de la morphine, dépourvu d'action centrale (puisqu'il ne franchit pas la barrière hémato-encéphalique), produit une analgésie par action sur les récepteurs périphériques aux opioïdes (Tegeder et al, 2003). Les effets périphériques des opioïdes sont intéressants car ils pourraient permettre une analgésie en absence des effets délétères centraux.

Des dérivés de la morphine sont également utilisés en clinique (Trescot et al, 2008), (Pasternak, 2012), (Ouvrage UPSA, « Pratique du traitement de la douleur », Pr Besson *et al.*, 2006). Leur efficacité est liée à leur affinité et leur action agoniste ou antagoniste sur les différents récepteurs aux opioïdes. Parmi les agonistes μ, le fentanyl, est le plus puissant. Il est utilisé en anesthésie pour son action rapide et son pouvoir supérieur à la morphine. La codéine, le dextropropoxyphène et le tramadol sont également des agonistes mais moins efficaces. Ils sont prescrits pour des douleurs faibles ou modérées, et ils sont souvent associés avec des salicylés ou du paracétamol (Kolesnikov et al, 2003; Pasternak, 2012; Zelcer et al, 2005). On peut aussi citer la méthadone, un agoniste μ puissant. Mais cette molécule synthétique est préférentiellement utilisée pour le sevrage des héroïnomanes plutôt qu'en thérapeutique.

Il existe également des agonistes partiels et des agonistes-antagonistes. Ces molécules agissent différemment sur les récepteurs μ et les récepteurs κ (Trescot et al, 2008), conduisant à des actions analgésiques plus ou moins importantes et des effets secondaires différents de la morphine.

L'antagoniste spécifique et compétitif des récepteurs de la morphine est la naloxone (Trescot et al, 2008). Elle permet de traiter des surdosages aux opiacés, mais elle est surtout employée en recherche pour explorer et comprendre les mécanismes d'action des opioïdes.

LES EFFETS INDESIRABLES

Les récepteurs aux opioïdes sont exprimés dans de nombreux organes, ce qui confère à ces anti-douleurs de nombreux effets secondaires indésirables. La présence de ces récepteurs sur les fibres musculaires lisses intestinales est à l'origine de la constipation, un des principaux effets délétères de la morphine, nécessitant souvent l'arrêt du traitement. Les effets centraux de la morphine incluent de nombreux effets néfastes tels que la sédation, l'euphorie et la dépression respiratoire. Bien que les effets indésirables des opioïdes soient nombreux, ils sont généralement contrôlables. Un des effets les plus connus, mais néanmoins assez rare, est la pharmacodépendance aux opioïdes (Ouvrage UPSA, « Pratique du traitement de la douleur », Pr Besson *et al.*, 2006). Elle est caractérisée par une dépendance psychique, physique et par un phénomène de tolérance. La dépendance psychique ou toxicomanie, reste rare dans l'utilisation analgésique des opioïdes car celle-ci est réalisée dans un cadre médical strict, où les doses et les règles de prescription sont rigoureusement contrôlées (Goldman, 1993). Le phénomène de tolérance aux opioïdes

implique une augmentation des doses efficaces au cours du traitement afin de maintenir un effet analgésique. Ce phénomène est assez débattu et très étudié. Néanmoins, il ne semble pas causer de réel problème en clinique car il se produit en général à des stades évolués de pathologies graves où le pronostic vital est engagé (Collin et al, 1993).

Les nombreux effets indésirables des opioïdes ne sont pas négligeables et restent lourds. Toutefois, l'utilisation de ces molécules puissantes est nécessaire, puisqu'elle constitue, dans certains cas de douleurs intenses ou de fin de vie, le seul traitement efficace. Face à cela, on réalise pleinement toute l'utilité de mieux comprendre les mécanismes douloureux dans le but de développer des molécules pharmacologiques spécifiques qui permettront une analgésie optimale et des effets indésirables réduits.

✓ D'AUTRES MOLECULES AU POUVOIR ANALGESIQUE

D'autres classes médicamenteuses possèdent des actions analgésiques. C'est le cas des antidépresseurs et des antiépileptiques (Sawynok et al, 2001), (Mitra & Jones, 2012). Ces deux familles de médicaments n'étaient à l'origine pas prévues pour traiter les douleurs mais leur utilisation courante en clinique a mis en évidence leur intérêt thérapeutique dans le traitement de certains syndromes douloureux chroniques. Enfin, il existe également les anesthésiques locaux, qui inhibent les canaux Na_v (Scholz, 2002), et un analgésique particulier, le ziconotide, qui est issu du venin du cône marin *Conus magnus*. Ce dernier est utilisé pour réduire les douleurs intenses, notamment en fin de vie (Staats et al, 2004).

Nous avons vu que de nombreuses classes pharmaceutiques peuvent être utilisées pour réduire des douleurs de type et d'intensité variés. Toutefois, certaines douleurs sont résistantes à la pharmacopée actuelle. C'est pourquoi certains patients, sur avis ou non de leur médecin, peuvent avoir recours à des médecines, dites parallèles, qui ne font pas appel à la chimie.

b. LES TRAITEMENTS NON MEDICAMENTEUX

La médecine moderne est encore démunie pour traiter certaines douleurs sévères ou chroniques. Malgré des progrès importants dans la compréhension des mécanismes physiologiques et physiopathologiques de la douleur, de nombreux processus restent incompris et/ou ne peuvent être contrôlés. Ainsi, parfois, aucun traitement pharmacologique efficace n'existe. Face à cette impasse thérapeutique et au désarroi des patients en proie à la douleur, le corps médical peut alors préconiser des thérapies ancestrales comme l'acupuncture et l'hypnose. L'effet placebo est également employé à l'insu du malade. Ces différentes pratiques, bien que critiquées par certains scientifiques, peuvent s'avérer très efficaces et améliorer la qualité de vie des patients.

✓ L'ACUPUNCTURE TRADITIONNELLE

L'acupuncture est née en Chine environ 2000 ans avant J-C. Depuis, cette pratique est utilisée communément dans le monde entier pour traiter les douleurs, malgré un certain scepticisme face aux difficultés à expliquer de manière rationnelle et scientifique son mode d'action. Certains attribuent même ses actions bénéfiques à un effet placebo.

En fait, les actions bénéfiques de l'acupuncture sont difficiles à évaluer et à estimer car les études cliniques sont entravées par des tailles d'échantillon inappropriées, des variables confuses, des résultats mal définis ou invalides et un manque de suivi (Wang et al, 2008). Toutefois, l'acupuncture apparaît comme efficace pour le traitement à court terme des douleurs de dos, des cervicales et des douleurs associées à l'ostéoarthrite (Wang et al, 2008). En revanche, les données obtenues concernant l'efficacité de l'acupuncture pour les douleurs dentaires ou périopératoires sont peu concluantes (Wang et al, 2008).

L'acupuncture consiste à insérer des aiguilles en des points spécifiques du corps. Depuis les dernières décennies, elle est très étudiée afin de comprendre ses mécanismes d'action. Dans cette pratique, toutes les fibres afférentes (Aβ, Aδ et C) sont activées (Zhao, 2008). L'analgésie induite par l'acupuncture agit essentiellement sur les processus de l'intégration de la douleur au niveau du système neveux central (Zhao, 2008). Grâce à des études moléculaires, cellulaires et à l'imagerie cérébrale fonctionnelle, les acteurs et les régions du cerveau impliquées dans cette analgésie ont été mis en évidence. De nombreux facteurs sont mis en jeu dans ce processus tels que les récepteurs aux opioïdes (μ, δ et κ), les récepteurs au glutamate (NMDA et AMPA), les récepteurs à la sérotonine et à la cholécystokinine (Zhao, 2008). Les opioïdes et leurs récepteurs spinaux jouent un rôle primordial dans l'analgésie générée par l'acupuncture. En effet, cette pratique conduit à la libération d'enképhalines et de dynorphine au niveau de la moelle (Zhao, 2008). De plus, les différences interindividuelles face à ce traitement seraient dues à l'expression génétique et à la densité de récepteurs à la cholécystokinine (Zhao, 2008). De nombreuses aires cérébrales, telles que le tronc cérébral et les régions limbique et préfrontale, sont impliquées dans l'analgésie produite par l'acupuncture chez l'animal et ont été confirmées par imagerie

fonctionnelle chez l'Homme (Zhao, 2008), (Dhond et al, 2007), (Napadow et al, 2007). Outre les nombreuses voies de signalisation mises en jeu dans l'acupuncture, une étude a documenté le rôle de l'adénosine comme médiateur de l'analgésie, via ses récepteurs A1. Le métabolisme de l'adénosine prolongerait ainsi le bénéfice clinique de l'acupuncture (Goldman et al, 2010).

✓ L'ELECTROSTIMULATION ET L'ELECTRO-ACUPUNCTURE

L'utilisation des stimulations électriques pour traiter la douleur remonte à des milliers d'années avant notre ère. Les Egyptiens, puis plus tard les Grecs et les Romains, avaient remarqué que certains poissons généraient des décharges électriques capables de soulager la douleur. L'utilisation de courants en médecine s'est développée grâce aux travaux de Christian Kratzenstein et Benjamin Franklin. Elle a permis le traitement de nombreuses pathologies tout au long du 19ème siècle. Puis, cette pratique est tombée en disgrâce au début du 20ème siècle, faute de fondements scientifiques et en raison du développement des médicaments analgésiques. En revanche, dans la seconde moitié du 20ème siècle, l'élucidation des mécanismes associés à cette pratique, notamment grâce à l'expérimentation animale et aux investigations cliniques, a donné un nouvel essor à cette technique.

L'électrostimulation consiste à appliquer un courant électrique directement sur la peau. L'action analgésique de cette technique est expliquée par deux mécanismes. D'une part elle induit l'inhibition des signaux de douleur vers le cerveau au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (Heidland et al, 2013) et d'autre part elle permet l'activation de la voie inhibitrice descendante générant une augmentation de la libération des opioïdes endogènes et d'autres composés neurochimiques (sérotonine, noradrénaline, acide gamma-aminobutyrique (GABA), acétylcholine et adénosine) (Heidland et al, 2013). L'électrothérapie moderne utilise principalement la stimulation électrique nerveuse transcutanée (TENS), ou percutanée (PENS) et l'électro-acupuncture. Ces approches sont efficaces pour traiter des douleurs modérées et des troubles musculo-squelettiques. La TENS consiste à placer des électrodes sur la peau, le long du trajet du nerf, proche de la zone douloureuse. La seconde technique, PENS, plus invasive, stimule directement un ou plusieurs nerfs à l'aide d'électrodes insérées sous l'épiderme. Enfin, l'électro-acupuncture relie les aiguilles d'acupuncture (stimulation des points d'acupuncture) à un stimulateur électrique. De manière intéressante, les canaux ioniques ASIC3 participeraient aux effets analgésiques de l'électro-acupuncture. En effet il a été rapporté récemment une réduction de l'expression de ces canaux dans un modèle murin d'hyperalgésie inflammatoire (Chen et al, 2011). De plus, des études utilisant l'électro-acupuncture sur les rongeurs ont montré une activation des récepteurs aux opioïdes dans le cortex cingulaire antérieur, ce qui se traduit par une inhibition des dimensions affectives et sensorielles de la douleur (Zhang et al, 2012). Au niveau périphérique, l'analgésie à long terme induite par l'électro-acupuncture impliquerait aussi les récepteurs aux opioïdes (Wang et al, 2013).

✓ L'HYPNOSE

L'hypnose est principalement utilisée en clinique pour éviter ou réduire les anesthésies médicamenteuses (réduction des douleurs aiguës lors d'une intervention chirurgicale) ainsi que pour soulager certaines douleurs chroniques. Cette technique, employée depuis des siècles, a souvent été controversée, à cause du manque de preuves scientifiques et de « signature physiologique ». D'autant plus que l'efficacité de cette approche est très variable selon les individus et que seulement 25 à 75 % des sujets sont « hypnotisables ». Toutefois, l'hypnose ne doit pas être prise à la légère puisque les études rapportées dans la littérature suggèrent qu'elle réduirait la douleur aiguë liée à une intervention chirurgicale dans au moins 50 % des cas (Stoelb et al, 2009).

L'hypnose agit au niveau périphérique et central pour réduire la perception de la douleur. Une première étude a mis en évidence une modification de l'état cérébral du sujet sous hypnose (Maquet et al, 1999). Par la suite, l'évolution des techniques de neuro-imagerie (Imagerie à Résonnance Magnétique fonctionnelle, IRMf, ou Tomographie à Emission de Positrons, TEP) a grandement amélioré la compréhension des mécanismes mis en jeu lors de cette pratique. Une cartographie des zones cérébrales impliquées dans la douleur et affectées lors de l'hypnose a été réalisée. Plusieurs régions corticales et sous corticales impliquées dans la douleur, dans les processus cognitifs, émotionnels et moteurs, jouent un rôle dans l'hypnose (Kiernan et al, 1995), (Langlade et al, 2002). Par exemple, le cortex cingulaire antérieur est activé sous hypnose, tandis qu'il est inactif à l'état d'éveil (Langlade et al, 2002). Chez l'Homme, des stimulations électriques du nerf saphène au court d'une analgésie suggérée par hypnose ont montré une augmentation des seuils douloureux, ainsi que des modifications des amplitudes des réflexes de flexion. Il a aussi été observé des réductions de l'amplitude des potentiels somato-sensoriels évoqués au niveau cérébral (Danziger et al, 1998).

✓ L'EFFET PLACEBO

L'effet placebo (du latin « *placebo* », « je plairai »), est défini comme l'effet d'une substance ou d'un traitement dénué de toute action pharmacologique et présenté comme efficace. Il peut s'agir d'un placebo pur, inerte sur le plan pharmacologique (lactose, sérum physiologique), ou d'un placebo impur, dont l'activité spécifique n'est pas démontrée scientifiquement (par exemple, l'homéopathie). Dans le traitement de la douleur, l'effet placebo est particulièrement important puisqu'il serait efficace dans 26 à 32 % des cas de migraine (Autret et al, 2012). Il serait même impliqué dans des pathologies graves comme les cancers (Chvetzoff & Tannock, 2003).

L'utilisation de placebo dans la médecine remonterait à l'Egypte ancienne. Plus récemment, des anecdotes prétendent qu'un médecin de la cour de Napoléon prescrivait un remède contre l'impuissance (*Aqua fontis + Illa repetita + Idem stillata + Hydrogeni*

protoxyde + *Nil aliud*) et fut disgracié suite à la traduction de sa formulation (eau de fontaine + la même répétée + la même distillée + H_20 + rien d'autre). Durant la seconde guerre mondiale, l'effet placebo a été utilisé sur les soldats blessés, en substitution de la morphine manquante (Beecher, 1955).

C'est en 1978, avec les travaux de Levine, que la neurobiologie ouvre ses recherches sur la compréhension de l'effet placebo et met en évidence une implication des endorphines endogènes dans l'action analgésique du placebo (Levine et al, 1978). En plus de la libération d'endorphines endogènes, l'analgésie liée au placebo induit une inhibition des systèmes nociceptifs impliquant la cholecystokinine. Des études sur des sujets réceptifs à l'effet placebo ont montré une réduction de l'analgésie liée au placebo après inhibition des voies opioïdes endogènes par la naloxone, ainsi qu'une augmentation du pouvoir analgésique du placebo lors de l'inhibition pharmacologique des récepteurs à la cholecystokinine (Benedetti, 1996). En outre, les techniques d'imagerie (TEP notamment) ont mis en évidence une modulation de l'activité de certaines zones cérébrales. L'administration de placebo induit en effet l'activation du système opioïde et la libération d'endorphines endogènes dans le cortex cingulaire, le noyau accumbens, le cortex orbito-frontal, la substance grise périaqueducale et l'amygdale. De plus, le système dopaminergique, impliqué dans le processus douloureux, est également activé (noyau caudé, putamen et noyau accumbens) (Scott et al, 2008), (Potvin et al, 2009).

Pour conclure, la médecine moderne est encore confrontée à une inefficacité thérapeutique dans le cas de certaines douleurs chroniques et intenses. En effet, les traitements les plus puissants, comme la morphine par exemple, ont des effets délétères si importants, qu'ils sont prescrits en dernier recours. En ce qui concerne les traitements plus anodins, comme les AINS ou le paracétamol, ils ne sont pas non plus dépourvus d'effets secondaires qui peuvent nécessiter l'arrêt de leur utilisation. C'est pour ces différentes raisons, qu'il est nécessaire de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques et des molécules pharmacologiques plus spécifiques. Dans ce but, la recherche actuelle travaille à mieux comprendre les mécanismes qui pourraient permettre de réduire les douleurs sans altérer d'autres fonctions physiologiques.

Parmi les nouvelles cibles thérapeutiques ayant émergé ces dernières années, les canaux ioniques sont particulièrement intéressants. Ils sont en effet impliqués à la fois dans la détection et dans la transmission du message douloureux puisqu'ils contrôlent le potentiel membranaire et l'excitabilité des neurones.

C'est pourquoi durant ma thèse je me suis plus particulièrement intéressée à l'étude des canaux ioniques ASIC impliqués dans différents types de pathologies douloureuses.

B. LES CANAUX IONIQUES ASIC

Au cours de ma thèse j'ai étudié les canaux ioniques de la famille des ASIC pour « Acid Sensing Ion Channels ». Les ASIC sont des canaux cationiques activés par l'acidité extracellulaire.

Dès les années 1980, l'équipe de Krishtal a mis en évidence des courants dépolarisants activés par les protons (H^+) dans la membrane des neurones sensoriels isolés des ganglions spinaux et trijumeaux (Krishtal & Pidoplichko, 1980). Des années plus tard, les études de Steen et de ses associés montrent que des infusions intradermiques acides au niveau de la peau génèrent une douleur non adaptative chez l'Homme, suggérant l'excitation de certains nocicepteurs (Steen et al, 1995a). Cette douleur cutanée soutenue, étudiée chez une trentaine de volontaires, est réduite par des antalgiques comme l'acide salicylique, appliqué localement (Steen et al, 1995b). Il faudra attendre l'année 1997 avec les travaux de Waldmann, réalisés au sein de l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC), pour que le clonage du « premier » membre des canaux sodiques de la famille des Dégénérines, activé par les protons, soit effectué (Waldmann et al, 1997b).

1. DIFFERENTS CANAUX ASIC

Les différentes sous-unités des canaux ASIC s'assemblent de manière hétérogène pour constituer une grande variabilité de courants ASIC.

a. LA DIVERSITE DES CANAUX ASIC

En 1997, le groupe de Michel Lazdunski a cloné pour la première fois un « canal ouvert par les protons », nommé ASIC, pour « Acid Sensing Ion Channel » (Waldmann et al, 1997b). Ce groupe a isolé du cerveau de rat un ADN codant une protéine composée de 526 acides aminés. Cette protéine est homologue aux membres de la famille des canaux ioniques Dégénérine (MEC et DEG) (Canessa et al, 1993), (Lingueglia et al, 1993), des canaux sodiques sensibles à l'amiloride (ENaC) et au canal FaNaC (Lingueglia et al, 1995) (**Figure 12**). Les canaux ENaC sont connus pour leurs rôles dans la perception du goût et dans l'homéostasie sodique chez les Mammifères. Les Dégénérines neuronales et musculaires, présentes chez le nématode *Caenorhabditis elegans,* sont impliquées dans la mécano-perception (Driscoll & Chalfie, 1991), (Syntichaki & Tavernarakis, 2004) et le canal FaNaC a été identifié dans le système nerveux des Invertébrés (Lingueglia et al, 1995), (Lingueglia et al, 2006).

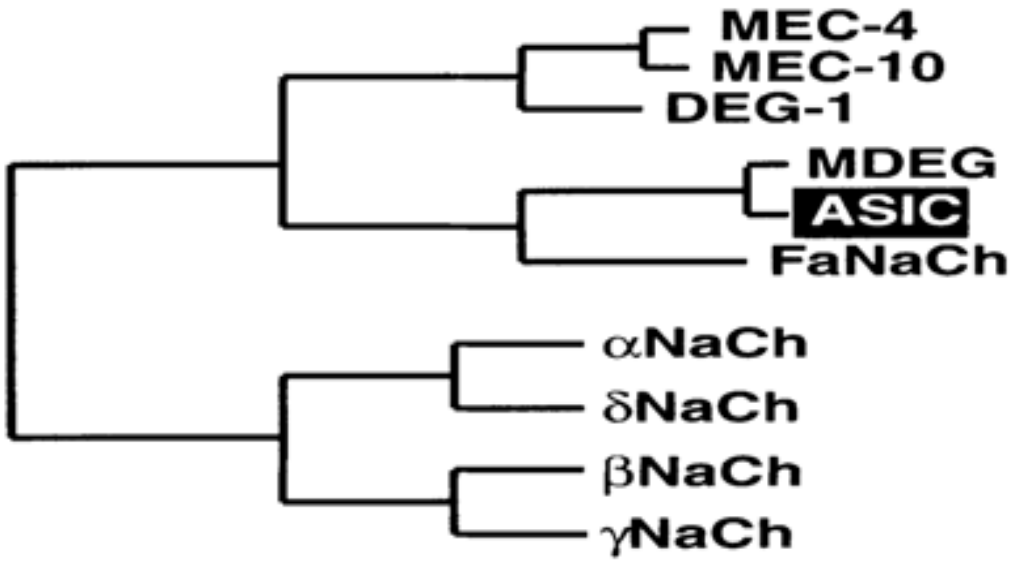


Figure 12 : Arbre phylogénétique des canaux de la famille ASIC.

Les canaux αNaCh, βNaCh, γNaCh, δNaCh sont des canaux sodiques sensibles à l'amiloride. MEC-4, MEC-10 et DEG-1 sont des Dégénérines de C. elegans. Le canal FaNaCh, exprimé chez les Invertébrés, est un canal sodique activé par le FMRFamide. Les canaux ASIC sont des canaux sodiques, sensibles à l'acidité, présents chez les Mammifères.

(D'après (Waldmann et al, 1997b)).

Quatre gènes codent les sous-unités ASIC1, ASIC2, ASIC3 et ASIC4, dont il existe plusieurs variants d'épissage chez les Mammifères (**Figure 13**). Chez les rongeurs, ASIC1 et ASIC2 existent sous la forme de deux variants d'épissage, ASIC1a (Waldmann et al, 1997b), ASIC1b (Chen et al, 1998), (Bassler et al, 2001), ASIC2a (Price et al, 1996), (Waldmann et al, 1996) et ASIC2b (Lingueglia et al, 1997). Un seul variant d'ASIC3 a été identifié chez les rongeurs (Waldmann et al, 1997a). De manière intéressante, chez l'Homme, il existe trois formes de la protéine ASIC3 (ASIC3a, ASIC3b et ASIC3c), qui diffèrent au niveau de leur domaine carboxy terminal (de Weille et al, 1998), (Babinski et al, 1999), (Delaunay et al, 2012). La protéine ASIC4 humaine est représentée par deux variants d'épissage divergents au niveau de la boucle extracellulaire (Akopian et al, 2000), (Grunder et al, 2000). Chez l'Homme, les rôles physiologiques de ces variants protéiques restent à établir.

Les différentes isoformes s'assemblent en homo ou en hétéro-trimères pour former un canal fonctionnel (Jasti et al, 2007), (Gonzales et al, 2009), à l'exception d'ASIC2b et d'ASIC4, qui ne forment pas de canal homo-mérique fonctionnel. La variabilité des assemblages confère à ces canaux des propriétés différentes telles que des sensibilités particulières aux protons, des cinétiques et des perméabilités ioniques spécifiques.

b. LA STRUCTURE DES CANAUX ASIC

Chaque sous-unité ASIC possède deux régions hydrophobes transmembranaires (TM1 et TM2) séparées par une large boucle extracellulaire, représentant plus de 50 % de la protéine, ainsi que deux courtes extrémités amino (N) et carboxy (C) terminales intracellulaires (**Figure 13**). La structure des protéines ASIC est relativement bien caractérisée grâce à la cristallisation du canal ASIC1a de poulet (Jasti et al, 2007). Ainsi, trois sous-unités identiques ou différentes s'assemblent pour former un canal, avec un pore fonctionnel (Jasti et al, 2007) (**Figure 13**, partie droite). L'homo-trimère ASIC1a présente une forme de calice avec de courtes extrémités N et C terminales, deux hélices transmembranaires et une région extracellulaire riche en ponts disulfures et en ions chlorures. Ce domaine extracellulaire contient de nombreux résidus acides et des paires carboxyl-carboxylate, suggérant qu'au moins un groupe carboxyl supporte un proton. Les études d'électrophysiologie et de mutagenèse (remplacement des résidus chargés par des résidus neutres) ont mis en évidence le rôle des paires carboxyl-carboxylate dans la sensibilité du canal aux protons. Entre les résidus acides et le pore se trouve un domaine « pouce », impliqué dans les changements conformationnels qui se produisent suite à la liaison des protons. Ces modifications de la conformation du canal permettent son ouverture.

En fait, chaque sous-unité du canal peut être comparée à un poing se refermant sur une balle. Ainsi, les différentes parties qui la constituent sont nommées avant-bras, pouce, doigt, articulation, paume et poignet (**Figure 14**). Selon ce modèle, les protons se fixent dans

une poche acide du côté extracellulaire. Cette liaison produit une rotation des hélices transmembranaires, qui entraîne un mouvement des domaines poignet et paume, conduisant à l'ouverture du pore du canal (**Figure 14**).

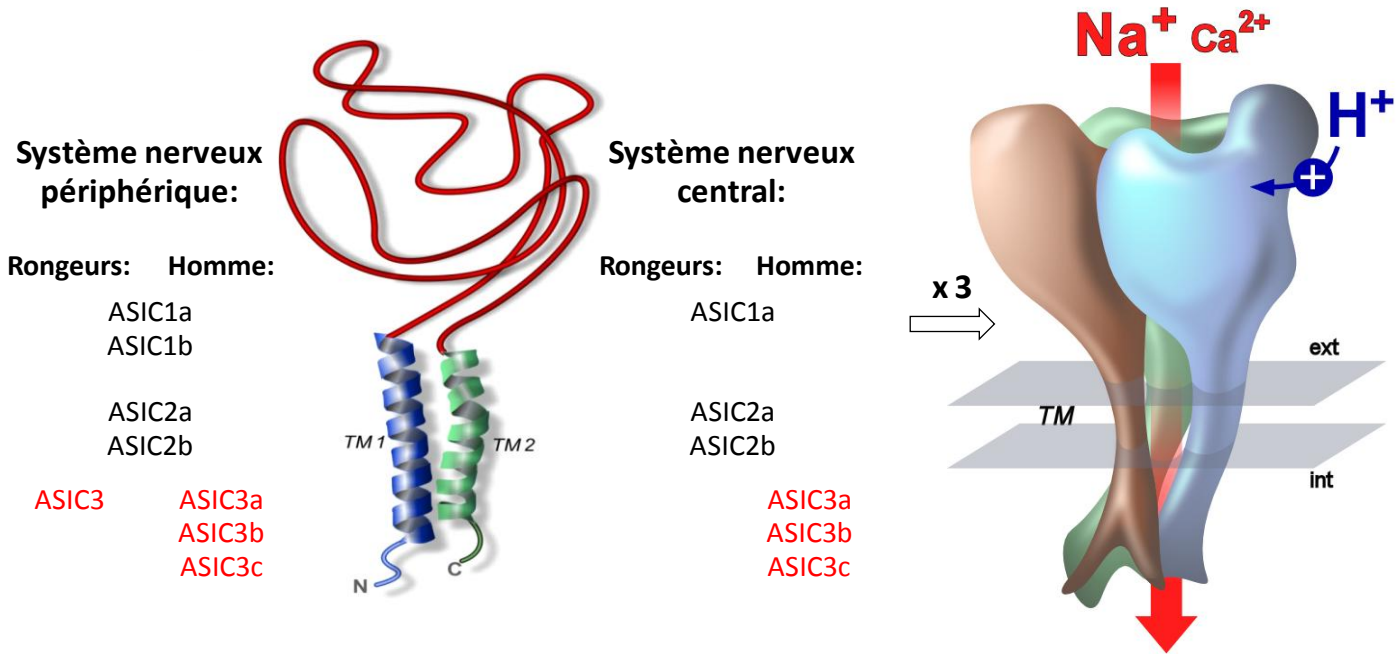


Figure 13 : Représentation d'une sous-unité ASIC, distribution et assemblage en trimère pour former un canal.

A gauche : Chaque sous-unité ASIC est constituée de deux domaines transmembranaires (TM1 et TM2), d'une large boucle extracellulaire (rouge) et de domaines amino (N) et carboxy (C) terminaux intracytoplasmiques (N, C). Chez les rongeurs, toutes les sous-unités ASIC sont retrouvées au niveau du système nerveux périphérique. ASIC1b et ASIC3 sont spécifiques de ce système. Chez l'Homme, il existe trois sous-unités ASIC3 (ASIC3a, b et c), qui sont également exprimées dans le système nerveux central.

A droite : Trois sous-unités ASIC identiques (homo-trimère) ou différentes (hétéro-trimère) s'assemblent pour former un canal fonctionnel, activé par les protons et perméable aux ions sodium (Na^+) (et calcium (Ca^{2+}) pour ASIC1a).

(Modifiée d'après (Deval et al, 2010))

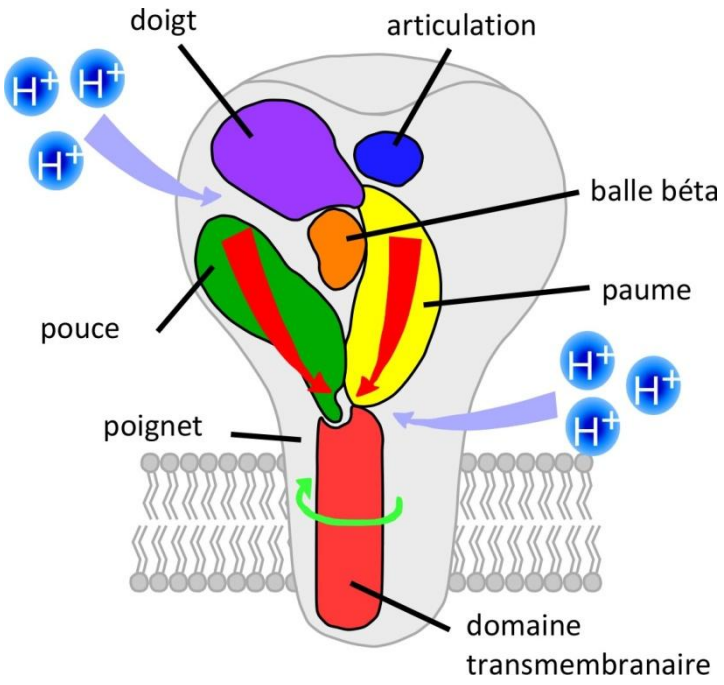


Figure 14 : Représentation schématique d'une sous-unité d'un canal ASIC.

Chacune des sous-unités ASIC est comparée à un poing renfermant une balle. Le doigt et l'articulation sont liés à la paume, qui juxtapose le pouce lié au poignet. Cet ensemble forme le domaine extracellulaire (main) qui renferme en son sein la balle β. L'avant-bras est rattaché au poignet et constitue le pore du canal, formé par les domaines transmembranaires 1 et 2 (TM1 et TM2).

Ce modèle spéculatif, basé sur la cristallisation du canal ASIC1a de poulet, permet d'appréhender les changements conformationnels qui se produisent suite à la liaison des protons. Le doigt et le pouce semblent être couplés à l'ouverture du canal via des interactions entre les résidus proches du Trp288 et les résidus de la terminaison ou du début du TM1 ou TM2, respectivement.

(Modifiée d'après (Jasti et al, 2007)).

c. LES MECANISMES D'OUVERTURE DES CANAUX ASIC

Des hypothèses ont été émises concernant les mécanismes d'ouverture/fermeture des canaux ASIC et les sites potentiels de liaison des protons (Salinas et al, 2006), notamment à partir des données structurales obtenues par la cristallographie du canal ASIC1 (Jasti et al, 2007), (Salinas et al, 2009), (Gonzales et al, 2009). Différentes régions seraient impliquées dans la sensibilité au pH. Une « poche acide », formée par un groupe d'acides aminés du domaine extracellulaire constitué de pairs carboxyl-carboxylate, a été mise en évidence comme senseur potentiel de l'acidité (Jasti et al, 2007). Ce site ferait le lien entre la fixation des protons et l'ouverture du canal, via le domaine TM1 (Jasti et al, 2007), (Li et al, 2009) (**Figure 14**). En effet, les travaux de Li et de ses collègues en 2009, montrent que l'interaction entre deux résidus aromatiques (Tyr72 et Trp288), situés respectivement juste après le TM1 et à l'extrémité de la boucle extracellulaire du côté du TM1, est essentielle pour l'activation des ASIC par les protons. Cette interaction conduit à un couplage fonctionnel entre le domaine extracellulaire et le domaine pore (Li et al, 2009). Une autre région, localisée à la base de la paume, pourrait être impliquée dans la sensibilité du canal aux protons (Paukert et al, 2008). Finalement, une troisième région, est située au niveau du domaine poignet et forme un cercle de charges négatives autour de l'entrée du canal. Ce cercle de charges négatives peut être protonné et il est probablement nécessaire pour l'ouverture du canal (Paukert et al, 2004). Lors de la liaison des protons dans la poche acide, au niveau du domaine paume et du domaine poignet, un changement de conformation se produit. Cela entraîne une rotation des hélices transmembranaires et permet l'ouverture du pore du canal (Jasti et al, 2007), (Gonzales et al, 2009), (Yang et al, 2009) (**Figure 14**). Les ions sodium (Na^+) peuvent accéder au pore via trois fenêtres : l'une localisée à la base du domaine extracellulaire, l'autre proche de la jonction avec les domaines transmembranaires (Jasti et al, 2007), et finalement la dernière par une voie le long de l'axe de symétrie du domaine extracellulaire (Gonzales et al, 2009).

Lors de l'acidification, les ions calcium (Ca^{2+}), liés au canal à l'état fermé, se déplacent. Cela modifie l'état d'ouverture du canal et régule son activité (Jasti et al, 2007), (Paukert et al, 2004), (Immke & McCleskey, 2003), (Sherwood et al, 2009). En effet, les ions Ca^{2+} extracellulaires ont des effets essentiellement inhibiteurs sur les canaux ASIC (Waldmann et al, 1997b), (Sutherland et al, 2001), (Paukert et al, 2004), (de Weille & Bassilana, 2001). Les canaux ASIC2a (de Weille & Bassilana, 2001) et ASIC3 (Sutherland et al, 2001) sont inhibés par une forte concentration de Ca^{2+} extracellulaire. Une levée du « bloc calcique » est nécessaire pour permettre la liaison des protons sur le canal ASIC3 et son activation (Immke & McCleskey, 2003). Les canaux ASIC1a sont régulés de différentes manières selon la concentration extracellulaire de Ca^{2+} (de Weille & Bassilana, 2001). Les courants ASIC1a, petits lorsque la concentration de Ca^{2+} est faible, sont potentialisés par l'augmentation de Ca^{2+} jusqu'à 5 mM, puis, ils sont réduits pour des concentrations calciques fortes (de Weille & Bassilana, 2001). Le Ca^{2+} bloque ASIC1a dans l'état ouvert (Paukert et al, 2004). La région impliquée dans la dépendance au Ca^{2+} du canal ASIC1a est située dans le

domaine extracellulaire. Elle est indépendante du site de haute affinité aux protons (Sherwood et al, 2009).

Les domaines cytosoliques du canal seraient également associés à la régulation de son ouverture (Chen & Grunder, 2007), (Salinas et al, 2009). Toutefois, leur structure tridimensionnelle n'étant pas connue, les mécanismes sont encore mal caractérisés.

2. PROPRIETES BIOPHYSIQUES DES CANAUX ASIC

Les canaux ASIC, selon la composition en monomères, ont des propriétés spécifiques en ce qui concerne la perméabilité ionique, la sensibilité aux protons et les cinétiques des courants.

a. LA PERMEABILITE IONIQUE

Les canaux ASIC sont des canaux dépolarisants majoritairement perméables aux ions Na^+ (Waldmann et al, 1997a), (Waldmann et al, 1997b). Parmi les ASIC, seul le canal ASIC1a est également perméable aux ions calcium (Ca^{2+}) (Waldmann et al, 1997b). Toutefois, selon les études, les mesures de la perméabilité varient avec un rapport P_{Na+}/P_{Ca2+} compris entre 2,5 et 50 (Waldmann et al, 1997b), (Bassler et al, 2001), (Yermolaieva et al, 2004). Ainsi, il a été décrit, suite à une acidification extracellulaire, une entrée de calcium dans les cellules neuronales du cortex, de l'hippocampe, des DRG (Waldmann et al, 1997b), (Bassler et al, 2001), (Sutherland et al, 2001) et dans les cellules exprimant le canal ASIC1a recombinant (Yermolaieva et al, 2004), (Samways et al, 2009). Cependant, cette entrée de Ca^{2+} dans les cellules, via les canaux ASIC1a, serait négligeable dans les conditions physiologiques (Samways et al, 2009) et semble être liée à l'activation secondaire des canaux calciques sensibles au voltage et à la libération des stocks calciques intracellulaires (Zha et al, 2006).

b. LES DIFFERENTS TYPES DE COURANTS ASIC

Les canaux ASIC sont, comme leur nom l'indique, activés par l'acidité extracellulaire. Les protons sont les seuls ligands endogènes des canaux ASIC connus à ce jour. Les sous-unités ASIC2b, qui ne sont pas activées par les protons lors d'un assemblage homomérique, peuvent s'associer avec d'autres sous-unités ASIC. Elles confèrent alors au canal hétéro-mérique des propriétés fonctionnelles particulières (Lingueglia et al, 1997), (Deval et al, 2004). Les associations variées des sous-unités permettent l'existence d'une grande diversité de courants ASIC natifs dans les différents types neuronaux (Krishtal & Pidoplichko, 1980) et sont à l'origine d'une pharmacologie spécifique (**tableau 1**). Les canaux ASIC sont

indépendants du voltage et ont des pH de demi-activation ($pH_{1/2}$) situés entre 4,0 et 6,8. Les canaux ASIC2 sont activés par des acidifications fortes et semblent peu impliqués dans les processus douloureux. Ils ne seront donc pas abordés ici. Les canaux ASIC1 et ASIC3 sont les plus sensibles aux protons. Ils sont activés pour de très faibles diminutions du pH extracellulaire (0,4 et 0,2 unité respectivement) par rapport au pH physiologique (pH 7,4). Leur $pH_{1/2}$ est situé autour de 6,5 (Yagi et al, 2006), (Lingueglia, 2007), (Deval et al, 2008). Cette forte sensibilité au pH acide fait de ces canaux de très importants senseurs de l'acidose extracellulaire. Ainsi, un changement brusque de l'acidité extracellulaire conduit à l'activation rapide d'un courant transitoire entrant qui se désensibilise (**Figure 15, panel A**) en quelques secondes. Dans le cas des courants de type ASIC1, la désensibilisation est complète (**Figure 15, panel A, à gauche**). Au contraire, les courants de type ASIC3 peuvent répondre à des modifications du pH sur un plus long terme puisqu'ils ne s'inactivent pas tant que l'acidité extracellulaire subsiste (Babinski et al, 1999), (Waldmann et al, 1997a), (Deval et al, 2008), (Deval et al, 2011) (Yagi et al, 2006) (**Figure 15, panel A, à droite**). Dans un premier temps, la diminution rapide du pH extracellulaire active le canal ASIC3, générant un courant transitoire entrant. Ce courant transitoire induit une dépolarisation membranaire qui peut conduire à la génération de potentiels d'action dans les neurones (Deval et al, 2003) (**Figure 16**). Dans un deuxième temps, un courant soutenu, dit courant de fenêtre, se développe (entre pH 7,3 et pH 6,6 pour l'isoforme de rat) (**Figure 15**). Ce courant est dû à la superposition des courbes d'activation et d'inactivation du canal en fonction du pH (**Figure 15, B**). Cette activité provoque une dépolarisation persistante (Yagi et al, 2006), (Deval et al, 2008) incapable de déclencher des potentiels d'action, mais qui sensibilise les neurones sensoriels à d'autres stimuli (Deval et al, 2003). Le courant soutenu d'ASIC3 se retrouve aussi dans le cas d'acidifications plus intenses, inférieures à pH 6,0. Ce dernier mécanisme à l'origine d'une dépolarisation persistante est différent du courant de fenêtre (Salinas et al, 2009). L'utilisation d'une chimère composée d'ASIC3 et d'ASIC1a a mis en évidence un rôle fondamental des domaines TM1 et N terminal du canal ASIC3 pour la génération des courants soutenus activés par de fortes acidoses (pH < 6,5). Le domaine TM1 module l'activation du courant transitoire rapide, dépendant du pH, qui contribue au courant de fenêtre (courant soutenu pour des pH proches des valeurs physiologiques). Enfin, les domaines C terminal et TM2 réguleraient négativement ces deux types de courants soutenus.

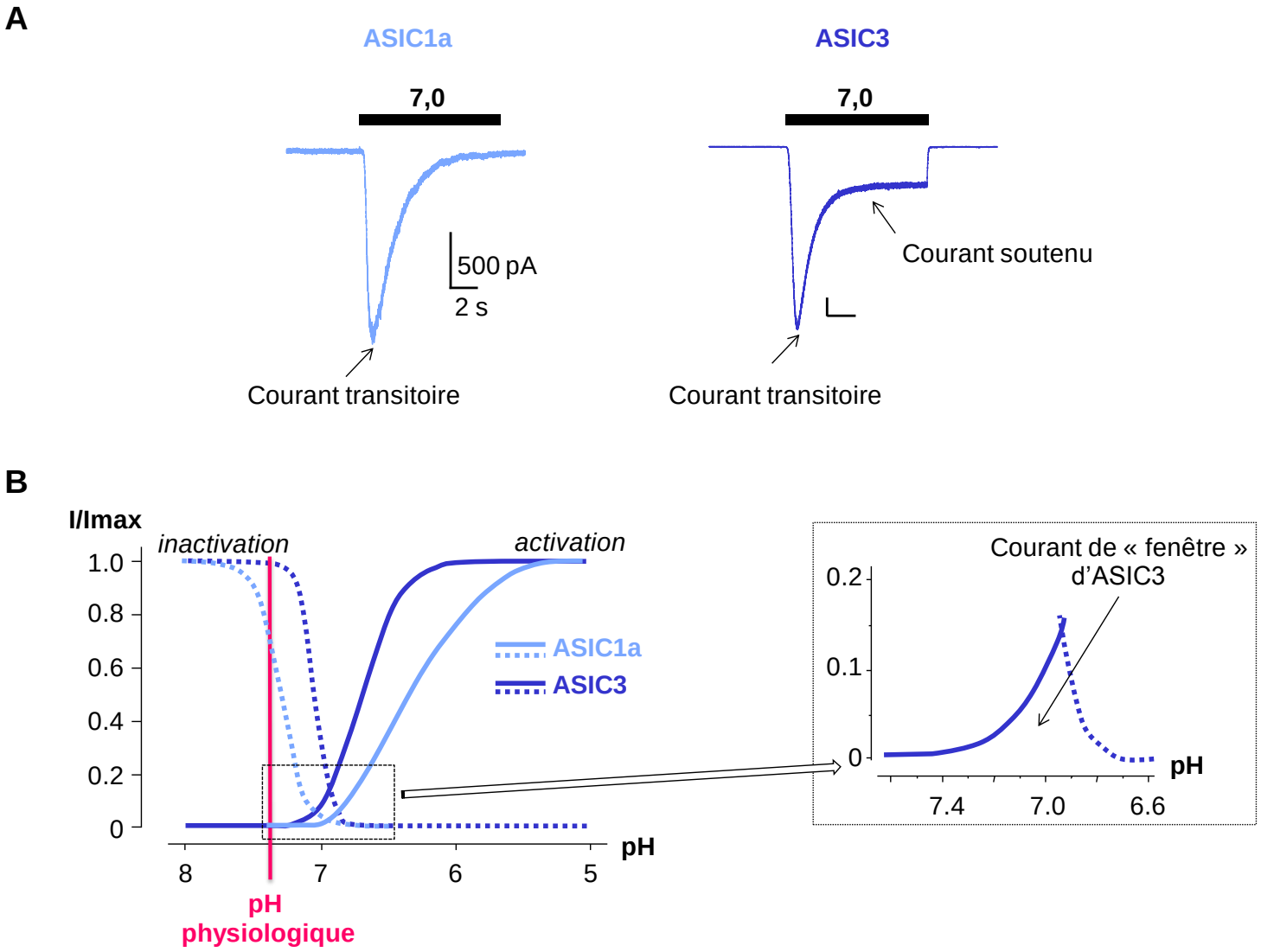


Figure 15 : Courants de type ASIC1a et ASIC3.

A : Représentation de courants de type ASIC1a et ASIC3 enregistrés en Patch Clamp, en configuration cellule entière.

Les canaux ASIC1a et ASIC3 sont activés par une acidification modérée du milieu extracellulaire (pH 7,4 à 7,0). Ces courants sont constitués d'une phase transitoire rapide. Le courant ASIC3 a la particularité de posséder, en plus du courant transitoire, un courant soutenu qui dure tant que le pH extracellulaire reste acide.

B : Courbe d'activation et d'inactivation des courants ASIC1a et ASIC3 en fonction du pH.

Contrairement au courant ASIC1a, il y a une superposition des courbes d'activation et d'inactivation pour le canal ASIC3. Cette particularité, appelée courant de « fenêtre » (encart), confère à ASIC3 un plateau ou courant soutenu, qui perdure tant que l'acidose se prolonge.

(Modifiée d'après (Deval et al, 2010)).

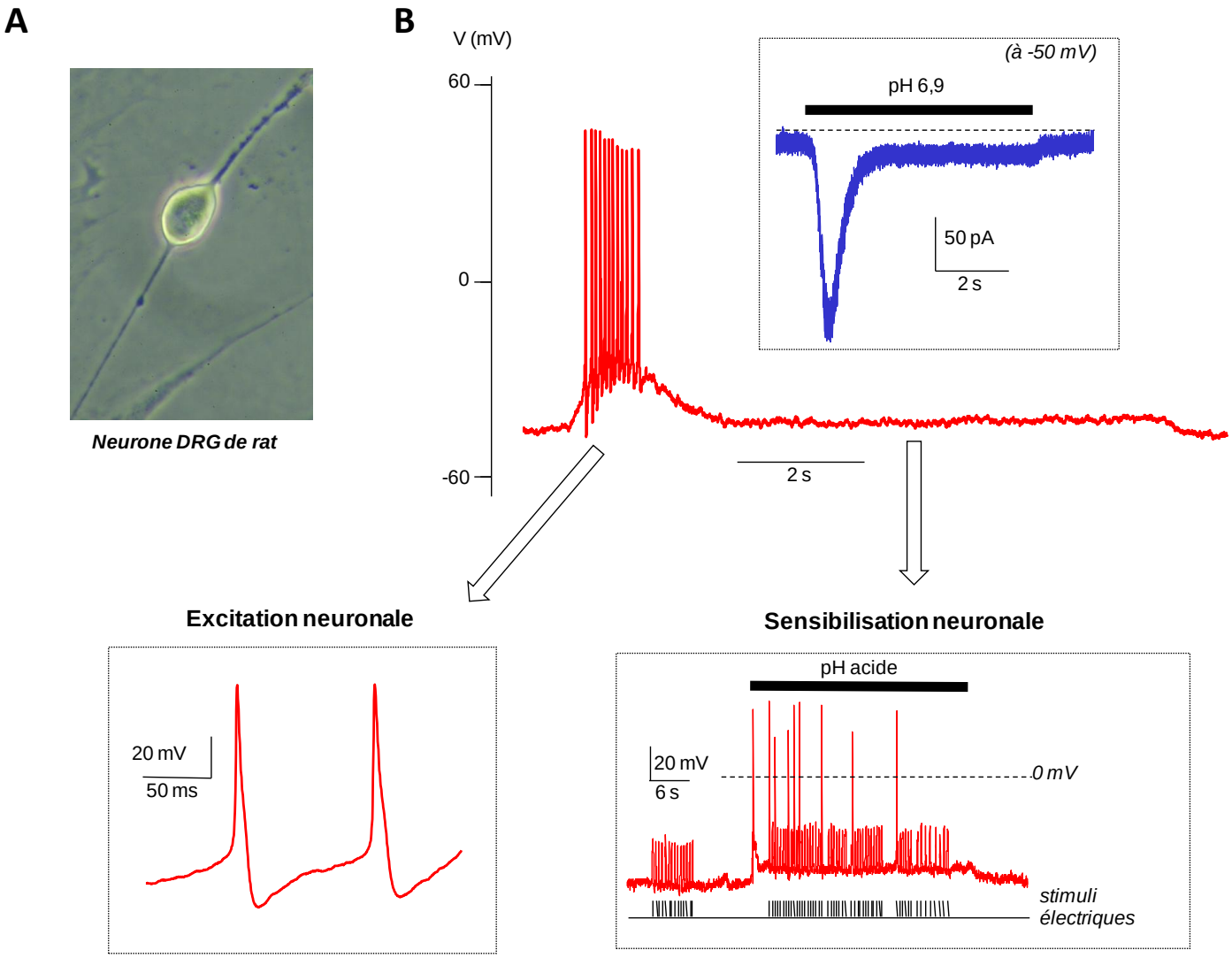


Figure 16 : Courant ASIC3 et excitabilité dans les neurones sensoriels.

A : Neurone sensoriel de DRG de rat en culture primaire *(grossissement x 400)*

B : Mesure de l'excitabilité neuronale et de l'activité des canaux ASIC3.
Le courant de type ASIC3 mesuré en voltage imposé à – 50 mV, est induit par un changement de pH de pH 7,4 à pH 6,9 (encart en haut à droite). L'excitabilité neuronale est mesurée en courant imposé (I = 0 pA) suite à un changement de pH de pH 7,4 à pH 6,9. L'acidification extracellulaire conduit à la génération de potentiels d'action (en bas à gauche) et à une sensibilisation du neurone sensoriel (encart en bas à droite). Les potentiels d'action (PA) ne se déclenchent pas pendant le plateau de dépolarisation.

Encart en bas à gauche :
Des PA sont générés suite à la dépolarisation déclenchée par la phase transitoire des canaux ASIC3.

Encart en bas à droite :
L'activité des canaux ASIC3 induite par une acidification modérée du milieu extracellulaire permet une dépolarisation de la membrane du neurone sensoriel qui perdure tant que l'acidose persiste. Des stimulations électriques sont appliquées de manière répétée durant l'enregistrement, avant et pendant la sensibilisation neuronale. Les impulsions électriques appliquées avant l'activation des canaux ASIC3 ne déclenchent aucun PA (à gauche de l'enregistrement). Au contraire, les mêmes impulsions électriques génèrent des PA quand elles sont appliquées pendant la dépolarisation soutenue induite par ASIC3 (à droite de l'enregistrement).

(Modifiée d'après (Deval et al, 2003)).

3. DISTRIBUTION TISSULAIRE DES ASIC

a. DANS LE SYSTEME NERVEUX

Les ASIC sont présents principalement dans tout le système nerveux. Alors que les neurones sensoriels périphériques expriment la plupart des ASIC, les neurones centraux expriment plus particulièrement certaines sous-unités (**Tableau 1**).

✓ DANS LE SYSTEME NERVEUX PERIPHERIQUE

Le premier courant ionique sensible aux protons a été mis en évidence dans les années 1980 dans les neurones isolés de DRG et de ganglion trijumeau de rat (Krishtal & Pidoplichko, 1980). L'existence de ce senseur de pH dans les terminaisons des neurones sensoriels laissait penser qu'il pouvait avoir un rôle dans la nociception (Krishtal & Pidoplichko, 1981). Ce n'est que des années plus tard, que ces senseurs ont été identifiés en tant que canaux ASIC (Waldmann et al, 1997b), (Waldmann et al, 1997a).

La plupart des canaux ASIC sont exprimés au niveau des neurones sensoriels qui innervent les muscles (Gautam & Benson, 2013), (Sluka et al, 2003), (Jospin & Allard, 2004), (Hoheisel et al, 2004), (Gitterman et al, 2005), (Gao et al, 2006), les articulations (Sluka et al, 2013), (Izumi et al, 2012), (Yuan et al, 2010b), (Yuan et al, 2010a), (Kolker et al, 2010), (Ikeuchi et al, 2008), (Ikeuchi et al, 2009) et les os (Jahr et al, 2005). Les canaux ASIC1a, ASIC2 et ASIC3 sont également présents au niveau des afférences qui innervent les organes comme le côlon, l'estomac, l'œsophage (Page et al, 2005) ainsi qu'au niveau du tissu cardiaque (Benson et al, 1999) et pulmonaire (Gu & Lee, 2006), (Fukuda et al, 2006), (Groth et al, 2006).

Les ARN messagers (ARNm) d'ASIC1, ASIC2 et ASIC3 sont exprimés au niveau des neurones sensoriels de DRG de rat (Waldmann et al, 1997b), (Lingueglia et al, 1997), (Chen et al, 1998), (Garcia-Anoveros et al, 2001), (Voilley et al, 2001), (Mamet et al, 2002), (Mamet et al, 2003). Ils sont notamment retrouvés dans les neurones de petits et de moyens diamètres, correspondant aux nocicepteurs impliqués dans la détection des stimuli nocifs (Voilley et al, 2001), (Price et al, 2000), (Price et al, 2001). De plus, il est intéressant de noter que l'expression des canaux ASIC1b et ASIC3 est spécifique du système nerveux périphérique chez les rongeurs (Waldmann et al, 1997b), (Chen et al, 1998). Toutefois, nous avons montré récemment que cette expression est différente chez l'Homme, où les ARNm d'ASIC3 sont également retrouvés au niveau du système nerveux central (Delaunay et al, 2012).

Les protéines ASIC2 et ASIC3 sont aussi exprimées dans les neurones de large diamètre, non nociceptifs, qui correspondent aux senseurs mécaniques de bas seuil (Garcia-

Anoveros et al, 2001), (Price et al, 2001), (Alvarez de la Rosa et al, 2002), (Price et al, 2000). Ces canaux sont localisés dans les structures spécifiques de la perception mécanique au niveau de la peau, telles que les cellules des corpuscules de Meissner, les terminaisons nerveuses de Merkel, ainsi que les terminaisons nerveuses entourant le bulbe du poil (Garcia-Anoveros et al, 2001), (Price et al, 2001), (Price et al, 2000). Les protéines ASIC sont détectées au niveau de la terminaison périphérique et du corps cellulaire des neurones de DRG (Garcia-Anoveros et al, 2001), (Alvarez de la Rosa et al, 2002). Le canal ASIC3 est présent dans plus de 50 % des afférences musculaires chez le rat (Molliver et al, 2005) et dans plus de 30 % des neurones sensoriels qui innervent l'articulation du genou chez la souris (Ikeuchi et al, 2009). Cette forte expression d'ASIC3 lui attribue un rôle fondamental.

Notons que la plupart des études a mis en évidence la présence des ARNm des ASIC dans les tissus par des techniques de Northern Blot, d'hybridation *in situ* et de RT-PCR. Les marquages immuno-histochimiques des différentes protéines ASIC sont plus rares et plus délicats à cause de problèmes de spécificité des anticorps.

✓ DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Parmi les ASIC, les transcrits ASIC1a, ASIC2a et ASIC2b sont largement exprimés dans différentes structures cérébrales comme le bulbe olfactif, le cortex, l'hippocampe Waldmann, 1997 #130}, (Bassilana et al, 1997), (Lingueglia et al, 1997), (Chen et al, 1998) et dans les neurones spinaux de second ordre qui reçoivent les signaux des afférences primaires (Baron et al, 2008). De plus, lors d'inflammation périphérique, l'expression des canaux ASIC1a et ASIC2a est augmentée dans la corne dorsale de la moelle (Voilley et al, 2001), (Mamet et al, 2002), (Wu et al, 2004), (Duan et al, 2007).

La localisation des ASIC au niveau de la moelle épinière, dans les zones impliquées dans la transmission et la plasticité synaptique, suggère leur participation dans les mécanismes de modulation de la douleur. Il a d'ailleurs été montré que les canaux ASIC1a jouent un rôle primordial dans les deux formes de sensibilisation centrale, que ce soit le « wind-up » (augmentation progressive de la fréquence des décharges des neurones de la corne dorsale), induit par stimulation des fibres C, ou l'hypersensibilité des neurones nociceptifs de la corne dorsale de la moelle, produite par le CFA (« Complete Freund's Adjuvant ») (Duan et al, 2007).

Dans le cerveau, les sous-unités ASIC1a et ASIC2, présentes dans la membrane post-synaptique des neurones de l'hippocampe, participent à la potentialisation à long terme et ont un rôle dans la mémoire et l'apprentissage spatial chez la souris (Wemmie et al, 2002). Les canaux ASIC1a, abondants dans des régions clés pour l'anxiété et la dépression comme l'amygdale, (Sluka et al, 2009), ont été impliqués dans la peur conditionnée (Wemmie et al, 2003), (Wemmie et al, 2004). Ils semblent moduler l'expression de marqueurs de la

dépression (Sluka et al, 2009). Ils participent également à la neuro-dégénérescence et aux maladies qui y sont associées. En effet, l'inhibition des ASIC par l'amiloride a un rôle neuro-protecteur dans un modèle de maladie de Parkinson (Arias et al, 2008) et dans un modèle de lésion traumatique cérébrale (Zhao et al, 2008). L'inhibition spécifique d'ASIC1a atténue la pathologie de Huntington (Wong et al, 2008). ASIC1 est aussi impliqué dans la sclérose en plaques puisqu'il contribue à la dégénérescence axonale lors de l'inflammation auto-immune du système nerveux central (Friese et al, 2007). Une étude a identifié ASIC1a comme un élément important de l'arrêt de la crise épileptique, agissant vraisemblablement par une activation des interneurones inhibiteurs, lors d'une acidose cérébrale. Ce canal a même été proposé comme une potentielle nouvelle cible thérapeutique pour l'épilepsie (Ziemann et al, 2008).

b. DANS LES AUTRES TISSUS ET ORGANES

Les ASIC sont exprimés dans de nombreux tissus en dehors du système nerveux, comme les testicules, où les canaux ASIC3 semblent impliqués dans la régulation des niveaux de testostérone chez les souris mâles (Burnes et al, 2008), ou encore la glande pituitaire, les poumons, les cellules immunitaires, les cellules urothéliales ainsi que dans les os. Ils sont également exprimés dans les cellules vasculaires lisses, au niveau desquelles les canaux ASIC2 jouent un rôle dans la migration cellulaire et dans la vasodilatation (Gannon et al, 2008). Les canaux ASIC1 et ASIC3, sont aussi présents au niveau du corps carotidien chez le rat (Tan et al, 2007).

Plusieurs ASIC ont été localisés au niveau des organes des sens. Dans la rétine, les canaux ASIC1a sont impliqués dans l'activité électrique conduisant à la transmission du signal visuel, et les canaux ASIC2 et ASIC3 ont des rôles protecteurs contre la dégénérescence (Brockway et al, 2002), (Brockway et al, 2005), (Ettaiche et al, 2006), (Ettaiche et al, 2009), (Ettaiche et al, 2004). Chez les rats, les canaux ASIC2 sont localisés dans les cellules associées à la perception du goût, où ils semblent jouer un rôle dans la perception de l'acidité (Ugawa et al, 2003). Chez l'Homme, des « délétions naturelles » des différents ASIC ont été identifiées dans les cellules du goût. L'absence de ces canaux provoque une agueusie acide (absence de la perception du goût acide), sans altération des autres modalités du goût comme le sucré, le salé ou l'amertume. Ces données suggèrent que la perception de l'acidité implique les ASIC et est indépendante de la perception des autres modalités du goût (Huque et al, 2009). Enfin, dans le système auditif périphérique, les canaux ASIC1, ASIC2 et ASIC3 sont nécessaires à la transmission de l'information auditive primaire des cellules ciliées de la cochlée au cerveau (Ugawa et al, 2006), (Hildebrand et al, 2004), (Zhang et al, 2008). Ainsi, les souris invalidées pour ASIC2 (Peng et al, 2004) et ASIC3 (Hildebrand et al, 2004) ont des déficits auditifs qui peuvent altérer le comportement maternel et compromettre le développement des petits (Wu et al, 2009).

Sous type d'ASIC	Localisation	pH1/2	Inhibiteurs	Modulateurs endogènes	Physiologie	Implications thérapeutiques potentielles
ASIC1a	SNP, cerveau, moelle épinière, rétine. Cellules du goût, système auditif périphérique et central, cellules immunitaires, os, cellules vasculaires	5,8 - 6,8	Amiloride et ses dérivés, AINS, A-317567, nafamostat, diarylamidines, Pb2+, Ni2+, Zn2+, Ca2+, PcTx1	Peptides Rfamide, dynorphines, AA, lactate, NO	Rôle important dans le SNC: transmission synaptique et plasticité, apprentissage et mémoire, peur, dépression, modulation centrale de la douleur via le système opioïde, sensibilisation centrale de la douleur au niveau de la moelle, transduction visuelle. Implication dans l'hyperalgie primaire musculaire, viscérale mais pas dans la perception mécanique cutanée, implication dans la chémotransduction acide dans le corps carotidien.	Inhibition: maladies psychiatriques (dépression, anxiété, stress), maladies neurodégénératives, douleur Activation: traitement de l'épilepsie
ASIC1b	SNP, cellules du goût, cellules cochléaires, carotide, cellules immunitaires	6,1 - 6,2	Amiloride, diarylamidines, Pb2+	NO	Nociception?	Douleur?
ASIC2a	SNP (structures cutanées spécialisées dans la perception mécanique), cerveau, moelle, rétine, système auditif, cellules du goût, os, cellules vasculaires, corps carotidiens	4,5 - 4,9	Amiloride, nafamostat, diarylamidines, A-317567, Cd2+	NO, Zn2+	Modulation d'ASIC1a dans le SNC, transduction visuelle, mécanoperception cutanée et viscérale, ouïe, goût, migration des cellules vasculaires	Contrôle de la pression sanguine, douleur ? Association génétiques avec la sclérose en plaques, l'autisme et le retard mental.
ASIC2b	SNP, cerveau, moelle, rétine, cellules du goût	NA	NA		Modulation des propriétés des autres ASIC (surtout ASIC2a et ASIC3)	Douleur ?
ASIC3	SNP (dont structures spécialisées dans la perception mécanique cutanée), rétine, cellules du goût, corps carotidien, oreille interne, testicules, os, cellules épithéliales pulmonaires, cellules vasculaires	6,4 - 6,6	Amiloride, AINS, A-317567, nafamostat, diarylamidines, Gd2+, Cd2+, Pb2+, APETx2	Peptides Rfamide, AA, lactate, NO, hypertonicité	Douleur cardiaque, douleur acide cutanée et inflammatoire primaire, l'hyperalgie mécanique secondaire dans les muscles et les articulations, perception mécanique viscérale et cutanée, perception acide dans les afférences gastroesophagiennes, maintien de l'intégrité de la rétine, ouïe, homéostasie de la testostérone, contrôle vasculaire local	Inhibition: douleurs inflammatoires, douleur musculaire chronique, arthrite, gastrite, maladies intestinales inflammatoires et non inflammatoires
ASIC4	SNP (faible), cerveau, moelle, glande pituitaire, rétine, oreille interne, cellules immunitaires	NA.	?	?	Modulation des propriétés des autres ASIC	?

Tableau 1 : Localisation et propriétés des différents ASIC.
(SNP : système nerveux périphérique ; SNC : système nerveux central)
(Modifié d'après (Noel et al, 2010) et (Wemmie et al, 2013)).

4. PHARMACOLOGIE DES CANAUX ASIC

Les canaux ASIC sont impliqués dans de nombreux mécanismes pathologiques (voir partie suivante, Rôles des canaux ASIC dans la douleur) et sont ainsi des cibles thérapeutiques intéressantes. Diverses molécules sont capables de réguler ces canaux (**Tableau 2**), de manière plus ou moins spécifique. Toutefois, elles ne sont pas élaborées dans le seul but de réduire la douleur en clinique. Elles permettent également à la recherche fondamentale de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques dans lesquels les canaux ASIC sont impliqués. C'est d'ailleurs en grande partie grâce à leur découverte que les rôles des ASIC ont été mis en évidence ces dernières années.

a. LES PETITES MOLECULES

De nombreuses petites molécules sont capables de réguler l'activité des canaux ASIC (**Tableau 2**). C'est le cas de plusieurs ions et de certains médicaments utilisés en clinique comme l'amiloride et ses dérivés et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).

✓ L'AMILORIDE ET SES DERIVES

L'amiloride, un médicament utilisé pour son action antidiurétique, est le premier inhibiteur identifié des ASIC (Waldmann et al, 1996), (Waldmann et al, 1997a). Il agit en bloquant le pore du canal. La concentration nécessaire pour inhiber 50 % de l'activité des canaux (IC_{50}) est comprise entre 5 et 100 µM. Toutefois, son effet est critiquable puisqu'il n'est pas spécifique des canaux ASIC et qu'il inhibe d'autres canaux et échangeurs ioniques (Frelin et al, 1988). A noter que l'amiloride a des effets paradoxaux puisqu'elle potentialise le courant soutenu d'ASIC3 induit par une acidose modérée (Yagi et al, 2006).

Le benzamil et l'EIPA (éthyl-isopropyl-amiloride), des dérivés de l'amiloride, sont également des bloqueurs non spécifiques des canaux ASIC et leur action est réversible (Deval et al, 2010). L'amidine A-317567, est un inhibiteur des ASIC plus spécifique que l'amiloride, avec une IC_{50} comprise entre 2 et 30 µM selon les différents types de canaux (Dube et al, 2005). Les effets analgésiques de l'amidine A-317567 sont plus puissants que ceux de l'amiloride dans des modèles de douleurs inflammatoires et post-opératoires chez le rat (Dube et al, 2005).

✓ LES IONS

Les canaux ASIC sont inhibés par de nombreux ions métalliques (Gd^{3+}, Pb^{2+}, Ni^{2+}, Cd^{2+}, Cu^{2+}) (Allen & Attwell, 2002), (Babinski et al, 2000), (Wang et al, 2007), (Staruschenko et al, 2007), (Wang et al, 2006), et des cations divalents (Ca^{2+},Mg^{2+} et Zn^{2+}) (Waldmann et al, 1997b), (de Weille & Bassilana, 2001), (Chu et al, 2004) (**Tableau 2**).

Classe	Composé	Effets sur les ASIC	Site d'action
Modulateurs endogènes			
Neuropeptides	Dynorphine A	Augmentation du courant induit par l'acide d'ASIC1a et des hétéromères ASIC1a-ASIC2b et ASIC1a-ASIC2a.	Extracellulaire
	Peptides de la famille du FMRFamide	Augmentation du courant soutenu induit par l'acide et ralentissement de l'inactivation d'ASIC1a, ASIC1b et ASIC3.	Extracellulaire
Polyamines	Spermine	Augmentation des courants ASIC1a, ASIC1b et ASIC1a-ASIC2a	Probablement extracellulaire
	Agmatine	Activation des courants ASIC3 homomériques et hétéromériques ASIC3-ASIC1b	Domaine extracellulaire
Cations	Ca2+, Mg2+, Cd2+, Cu2+, Gd3+, Ni2+, Pb2+, Zn2+, Ba2+	Inhibition de la plupart des canaux ASIC homo et hétéromériques	Varié selon les ions et les canaux.
Autres	Acide arachidonique	Augmentation du courant entrant soutenu	Non connu
	Lactate	Potentialisation de l'amplitude de courant en réponse à l'acidité	Indirect, par chélation des ions divalents extracellulaires
	Oxyde nitrique	Potentialisation des courants ASIC1a, ASIC1b, ASIC2b et ASIC3 homomériques par les donneurs d'oxyde nitrique	Probablement extracellulaire
	ATP	Augmentation de la sensibilité au pH des homomères ASIC3	Probablement via les récepteurs purinergiques P2X
	Sérotonine	Augmentation des courants soutenus ASIC3	Extracellulaire
Modulateurs exogènes			
Toxines de venins animaux	PcTx1	Désensibilisation des homomères ASIC1a et des hétéromères ASIC1a-ASIC2b	Extracellulaire, au niveau des « poches acides »
	APETx2	Inhibition des canaux contenant ASIC3	Non connu. Probablement extracellulaire
	MitTx	Activation des canaux homomériques ASIC1a et ASIC1b et augmentation de la sensibilité au pH des canaux ASIC2a	Sur un site de liaison extracellulaire inconnu
	Mambalgine 1	Inhibition des courants ASIC1a et ASIC1b homomériques et des hétéromères ASIC1a-ASIC2a, ASIC1a-ASIC2b et ASIC1a-ASIC1b	Non connu
	Anm TX Ugr 9a-1	Inhibition des courants ASIC3 humains transitoires et soutenus	Non connu
Anti-inflammatoires non stéroïdiens	Flurbiprofen, ibuprofen, aspirine, acide salicylique, diclofénac	Réduction des courants ASIC1a et ASIC3	Non connu
Autres	Amiloride et ses dérivés	Réduction de tous les courants ASIC	Non connu. Plusieurs sites de liaison possibles dans le domaine extracellulaire et le pore
	A-317567	Inhibition des courants ASIC endogènes induits par l'acidité dans les neurones de DRG de rat et dans les neurones centraux de souris	Non connu
	GMQ	Activation d'ASIC3 au pH physiologique	Domaine de liaison extracellulaire
	Nafamostat	Inhibition d'ASIC1a et ASIC2a et ASIC3 dans la phase initiale du courant transitoire	Non connu
	Arcaïne	Activation d'ASIC3	Domaine de liaison extracellulaire

Tableau 2 : Pharmacologie et régulations des ASIC. *(Modifié d'après (Wemmie et al, 2013))*

En effet, les courants ASIC1a, ASIC2a (de Weille & Bassilana, 2001) et ASIC3 (Sutherland et al, 2001), (Immke & McCleskey, 2003) sont réduits lorsque la concentration extracellulaire est élevée en calcium (de Weille & Bassilana, 2001). Cet effet serait du à la compétition qui existerait entre les ions calcium et les protons. Comme nous l'avons vu précédemment, en se fixant sur un site extracellulaire du domaine pore du canal ASIC, les ions Ca^{2+} empêcheraient la fixation des protons et bloqueraient ainsi l'ouverture du canal (Immke & McCleskey, 2003), (Paukert et al, 2004).

Les ions Zn^{2+} extracellulaires ont deux effets distincts. A une concentration micro-molaire, ils potentialisent l'activation des courants générés par des multimères contenant ASIC2a (Baron et al, 2001) et des courants ASIC natifs dans les neurones d'hippocampe (Baron et al, 2002). En revanche, à une concentration nano-molaire, ils ont un effet inhibiteur sur les courants ASIC1a et ASIC1a/ASIC2a (Chu et al, 2004). Ainsi, le Zn^{2+} pourrait jouer un rôle important dans le contrôle de la surexcitation des neurones lors de la transmission synaptique normale, et au cours de l'excitotoxicité liée à ASIC1a dans les conditions pathologiques (Chu et al, 2004).

✓ LES ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROÏDIENS (AINS)

En plus de leurs effets sur les cyclo-oxygénases (COX), les AINS inhibent l'activité des canaux ASIC1a et ASIC3 aux concentrations thérapeutiques (IC_{50} pour ASIC3 comprise entre de 92 et 260 µM selon les AINS) (Voilley et al, 2001). Ils empêchent également l'augmentation de l'expression des ASIC induite par l'inflammation dans les neurones sensoriels (Voilley et al, 2001). D'autre part, certains AINS comme l'aspirine, le diclofénac et le flurbiprofen inhibent directement les courants ASIC dans les neurones sensoriels (Voilley et al, 2001). Par conséquent, la capacité des AINS à combiner le blocage des COX et l'inhibition des ASIC est considérable pour leur action analgésique.

✓ LE GMQ (GUANIDINE-4-METHYLQUINAZOLINE) ET LES MOLECULES SIMILAIRES

La plupart des molécules évoquées jusqu'à maintenant ont des rôles inhibiteurs des canaux ASIC. Toutefois, certaines familles de molécules découvertes récemment sont capables de potentialiser les courants ASIC induits par l'acidification extracellulaire. Elles sont même capables d'activer directement les canaux ASIC au pH physiologique. En 2010, pour la première fois, les travaux de Yu *et al*, proposent une molécule synthétique, le 2-guanidine-4-methylquinazoline (GMQ), comme activateur direct des canaux ASIC3, en conditions normales de pH (concentration efficace médiane (EC_{50}) = 1,1 $^{+}/_{-}$ 0,1 mM) (Yu et al, 2010) (**Tableau 2**). Cette molécule active les canaux ASIC3 via deux résidus du domaine paume extracellulaire, et cela de manière indépendante des protons. De plus, la même équipe a montré qu'une polyamine endogène, structurellement similaire au GMQ, était capable d'activer les canaux ASIC3 à la concentration de 1 mM (Li et al, 2010). Ce ligand endogène, l'agmatine, est un métabolite de l'arginine. L'agmatine et son analogue l'arcaïne,

activent les canaux ASIC3 homomériques ou ASIC3/ASIC1b hétéromériques au pH physiologique, via un site de liaison différent de celui des protons. En outre, les auteurs documentent une coopération entre l'agmatine et des signaux inflammatoires comme l'acidose modérée, l'hyperosmolarité, l'acide arachidonique et l'acide lactique.

b. LES NEUROPEPTIDES DE LA FAMILLE DU FMRFAMIDE

Le neuropeptide FMRFamide, spécifique des Invertébrés, était connu comme un activateur des canaux ENac, de la famille des ASIC (Lingueglia et al, 1995). C'est pourquoi ses effets ont été vérifiés sur les canaux ASIC. Il s'est avéré que le FMRFamide et les neuropeptides de la même famille, le neuropeptide FF (NPFF, FLFQPQRFamide) et le neuropeptide SF (NPSF, SLAAPQRFamide), étaient capables, non pas d'activer directement, mais de potentialiser les canaux ASIC1 et ASIC3 activés par les protons (Askwith et al, 2000), (Deval et al, 2003), (Lingueglia et al, 2006) (**Tableau 2**). Les canaux qui expriment la sous-unité ASIC3 sont les plus sensibles. Ces peptides augmenteraient le courant soutenu et/ou ralentiraient l'inactivation du canal ASIC3, ce qui provoque une phase soutenue lors d'acidification tissulaire (Deval et al, 2003). De manière intéressante, le NPFF et le NPSF sont présents dans le système nerveux des Mammifères, notamment dans la moelle épinière, (Vilim et al, 1999) et dans les neurones de DRG (Allard et al, 1999). De plus, il est intéressant de noter qu'en conditions inflammatoires, l'expression des précurseurs du NPFF est augmentée, parallèlement à celle des ASIC (Duan et al, 2007). Par conséquent, ces peptides pourraient participer à la régulation de l'excitabilité des neurones en conditions inflammatoires (Deval et al, 2003).

c. LES PEPTIDES D'ORIGINE ANIMALE

Les modulateurs, sans doute les plus connus des ASIC, sont des toxines isolées de venins animaux, parmi lesquelles la Psalmotoxine 1 (PcTx1), l'APETx2, la MitTx, les Mambalgines et un peptide découvert très récemment l'AnmTX Ugr 9-1 (**Tableau 2**).

✓ LA PSALMOTOXINE 1

La Psalmotoxine 1 (PcTx1), isolée au laboratoire, provient d'un venin d'araignée *Psalmopoeus cambridgei* (Escoubas et al, 2000). Ce peptide, composé de 40 acides aminés, bloque les canaux homomériques ASIC1a (IC_{50} = 0,9 nM) (Escoubas et al, 2000). Cette toxine, injectée de manière intrathécale ou intracérébroventriculaire, a un effet analgésique chez

les rongeurs (Duan et al, 2007), (Mazzuca et al, 2007). De plus, les mécanismes d'action de PcTx1 sur le canal ASIC1a sont bien caractérisés. La toxine se fixe avec une grande affinité sur la boucle extracellulaire du canal ASIC1a homotrimérique. Plus précisément, elle se lie au niveau de la « poche acide » (zone fondamentale pour la sensibilité du canal aux protons), à l'interface entre deux sous-unités (Qadri et al, 2009), (Salinas et al, 2006), ce qui stabilise le canal dans l'état inactivé (Qadri et al, 2009). PcTx1 augmente l'affinité apparente du canal pour les protons et ainsi, le désensibilise (Chen et al, 2005). La toxine PcTx1 interagit également avec ASIC1b à l'état ouvert. Ainsi, au lieu d'inhiber l'activité du canal, elle favorise son ouverture en réponse à une faible acidification (Chen et al, 2006).

✓ L'APETX2

La toxine APETx2, isolée elle aussi au laboratoire, provient de l'anémone de mer *Anthopleura elegantissima* (Diochot et al, 2004). Elle inhibe l'activité des canaux ASIC3 homomériques (IC_{50} = 63 nM), hétéromériques (IC_{50} = 117 nM à 2 µM) et les courants de type ASIC3 retrouvés dans les neurones sensoriels de DRG (IC_{50} = 216 nM). En revanche, sa spécificité a été récemment remise en cause. Effectivement, APETx2 n'inhiberait pas uniquement les canaux ASIC3, mais réduirait également l'activité des canaux Nav1.8, impliqués dans les processus douloureux (Blanchard et al, 2012), (Peigneur et al, 2012). Cette découverte remet en question certaines études *in vivo* où cette toxine était le seul argument démontrant le rôle des canaux ASIC3. Néanmoins, l'affinité d'APETx2 reste supérieure pour les canaux ASIC3 natifs dans les neurones de DRG comparée à celle des Nav1.8 (216 nM vs 2,6 µM) (Blanchard et al, 2012). Notons toutefois que ce mécanisme d'action, inhibant, à la fois les canaux ASIC3 et les canaux Nav1.8, devient un avantage du point de vue thérapeutique. En effet, cette toxine présente de forts effets analgésiques lorsqu'elle est appliquée en périphérie (Deval et al, 2008), (Deval et al, 2011), (Karczewski et al, 2010), (Yan et al, 2013), (Izumi et al, 2012). Par contre, contrairement à la liaison de PcTx1 sur ASIC1a, le mécanisme d'action d'APETx2 sur le canal ASIC3 est peu documenté.

✓ LA MITTX

Le venin du serpent corail du Texas *Micrurus tener tener*, est connu pour provoquer une douleur intense et sans relâche lors d'une morsure. La purification récente des substances actives du venin a permis d'isoler la toxine MitTx (Bohlen et al, 2011). Les auteurs de cette étude ont montré que cette toxine est un agoniste puissant, persistant et sélectif des canaux ASIC, avec une efficacité égale ou supérieure à un pH acide. La MitTx est très sélective pour les sous-unités ASIC1a (EC_{50} = 9 $^{+}/_{-}$ 1 nM) et ASIC1b (EC_{50} = 23 $^{+}/_{-}$ 4 nM) à pH physiologique. Dans des conditions plus acides (pH < 6,5), elle potentialise massivement (plus de 100 fois) l'activité des canaux ASIC2a activés par les protons. Cette toxine, suscite un comportement douloureux robuste chez les souris sauvages et les souris invalidées pour les canaux ASIC3. Au contraire, les effets proalgiques de l'injection intraplantaire de la MitTx disparaissent chez les souris invalidées pour ASIC1a. Ces résultats révèlent un mécanisme

proalgique original produit par les venins de serpent, et mettent en évidence une contribution inattendue d'ASIC1 dans la nociception.

✓ LES MAMBALGINES

Les Mambalgines (Mamb-1, Mamb-2 et Mamb-3) sont des toxines à trois doigts, présentes dans le venin d'un autre serpent, le mamba noir *Dendroaspis polylepis polylepis*. Récemment, des membres de l'équipe ont montré que ces toxines suppriment la douleur chez les rongeurs par inhibition des ASIC exprimés dans les neurones centraux ou périphériques (IC_{50} comprises entre 55 et 252 nM selon les canaux ASIC) (Diochot et al, 2012). Cet effet analgésique lors d'une injection centrale ou périphérique est aussi puissant que la morphine. Mais, de manière intéressante, l'action centrale des Mambalgines est résistante à la naloxone (antagoniste des récepteurs aux opioïdes), cause peu de tolérance et ne produit aucune détresse respiratoire. Cela démontre une action analgésique indépendante des opioïdes endogènes. Les injections *in vivo* de Mambalgines, combinées à l'utilisation d'animaux invalidés pour les sous-unités ASIC, indiquent que l'analgésie est due à un blocage des canaux hétéromériques ASIC1a/ASIC2a dans les neurones centraux de la moelle épinière et des canaux contenant ASIC1b dans les nocicepteurs.

✓ L'ANMTX UGR 9-1

Trois peptides ont été découverts très récemment dans le venin de l'anémone de mer *Urticina grebelnyi* (Osmakov et al, 2013). Ces peptides, constitués de 29 acides aminés, ont une structure primaire proche des autres peptides connus d'anémone de mer mais ne présentent pas d'homologie de séquence avec APETx2. Parmi eux, seul l'AnmTX Ugr 9-1 a révélé un effet inhibiteur sur les canaux ASIC3 en électrophysiologie et un effet analgésique *in vivo* sur les souris. Ce peptide réduit de manière réversible les courants ASIC3 humains, exprimés dans les ovocytes de Xénope. Le courant ASIC3 transitoire est totalement bloqué par le peptide (IC_{50} autour de 10 µM) et le courant soutenu est inhibé de moitié (IC_{50} autour de 1,5 µM). Des tests de douleur acide abdominale et d'hyperalgie thermique inflammatoire chez les souris ont démontré des effets analgésiques du peptide injecté par voie intraveineuse. De plus, des tests moteurs (Rotarod) n'ont pas montré de déficits en présence de la toxine. Par ailleurs, l'analyse structurale de ce nouveau peptide a révélé une structure spatiale en hélices β peu commune.

La découverte de cette nouvelle toxine inhibitrice d'ASIC3 confirme le rôle important de ce canal dans la douleur.

5. ROLES DES CANAUX ASIC DANS LA DOULEUR

Les canaux ASIC, présents en majorité dans le système nerveux, sont impliqués dans les mécanismes de la douleur aiguë, inflammatoire ou neuropathique. Ces douleurs touchent les tissus superficiels, comme la peau, les tissus profonds, comme les muscles, les articulations, ou encore les organes internes, comme les organes digestifs, le cœur, les poumons.

a. ROLES DANS LES DOULEURS PERIPHERIQUES

Les canaux ASIC sont de fins senseurs de l'acidité. Ils sont activés par de faibles diminutions autour du pH physiologique et sont ainsi à l'origine des principaux courants sensibles aux protons dans les neurones sensoriels. Cela leur confère un rôle primordial dans la nociception, contrairement aux canaux TRPV1, qui sont activés par des conditions d'acidoses plus extrêmes (Caterina et al, 1997), (Ugawa et al, 2002), (Tominaga et al, 1998).

✓ DOULEUR SOMATIQUE

Les canaux ASIC sont impliqués dans la douleur dite somatique, qui comprend la douleur cutanée superficielle et la douleur musculaire, plus profonde.

DOULEUR CUTANEE

Malgré la connaissance de la localisation et des propriétés des canaux ASIC dans les nocicepteurs, leur implication dans la douleur cutanée est relativement récente. Effectivement, les premières études menées sur les souris invalidées pour les canaux ASIC1a, ASIC2 et ASIC3 ne révélaient aucun phénotype clair (Price et al, 2000), (Price et al, 2001), (Chen et al, 2002), (Page et al, 2004). Les souris invalidées pour ASIC3 ont une réponse douloureuse normale suite à l'injection de solutions acides au niveau de la peau de la patte. Elles ne montrent pas de différence avec les souris sauvages dans l'hyperalgie thermique à la suite d'une injection de carragénine (Price et al, 2001), (Chen et al, 2002). De plus, de manière inattendue, en l'absence d'ASIC3, les souris semblent plus sensibles aux stimuli douloureux d'intensité modérée à forte (Chen et al, 2002). De même, la sous-expression d'ASIC3 à l'aide d'un dominant négatif, conduit à une augmentation de la sensibilité aux stimuli acides, mécaniques et inflammatoires (Mogil et al, 2005). Les canaux ASIC2 ont également été peu impliqués dans les douleurs superficielles cutanées chez les souris. En effet, les courants mesurés en réponse à l'acidité, aussi bien dans les neurones sensoriels en culture que dans les nocicepteurs de souris invalidées pour le gène ASIC2, ne montrent aucune altération (Price et al, 2000). Enfin, la délétion d'ASIC1a n'altère ni les réponses des

fibres sensorielles aux stimulations mécaniques, ni les comportements douloureux induits par des stimulations mécaniques et thermiques chez les souris (Page et al, 2004). Le canal ASIC1 ne semble donc pas influencer la perception mécanique cutanée, contrairement à son rôle au niveau viscéral (Page et al, 2004).

Ces premières données, obtenues chez les souris, ne permettaient aucune implication claire des ASIC dans la perception douloureuse acide au niveau de la peau.

C'est dans un second temps, que les études pharmacologiques menées chez les rats et chez l'Homme ont permis de démontrer le rôle des ASIC dans la perception de la douleur acide cutanée (Ugawa et al, 2002), (Jones et al, 2004), (Dube et al, 2005), (Deval et al, 2008). En effet, des expériences menées sur des volontaires sains, ont montré que l'injection de solution acide sous-cutanée induit une douleur, qui peut être inhibée par l'amiloride et les AINS (Ugawa et al, 2002), (Jones et al, 2004). De plus, chez les rats, le bloqueur spécifique des ASIC, le A-317567, inhibe l'hyperalgie thermique inflammatoire et la douleur post-opératoire (Dube et al, 2005). Il a également été montré une inhibition de la douleur inflammatoire cutanée chez les rats par des bloqueurs non sélectifs des ASIC (amiloride ou benzamil) (Rocha-Gonzalez et al, 2009). L'inhibition d'ASIC3 par la toxine d'anémone de mer, APETx2, et par des oligonucléotides antisens, démontre clairement le rôle de ce canal dans la douleur cutanée et dans l'hyperalgie inflammatoire chez le rat (Diochot et al, 2004), (Deval et al, 2008). Ces données sont en accord avec l'augmentation de l'expression et de l'activité d'ASIC3 dans les neurones sensoriels de DRG suite à une inflammation, en réponse à divers composants de la soupe inflammatoire comme la bradykinine, la sérotonine (Deval et al, 2004), l'hypertonicité (Deval et al, 2008), l'acide arachidonique (Smith et al, 2007), (Deval et al, 2008) et l'oxyde nitrique (Cadiou et al, 2007). L'ensemble des régulations d'ASIC3 laisse penser que ce canal participerait à la sensibilisation périphérique des nocicepteurs cutanés lors d'inflammations (Mamet et al, 2003), (Deval et al, 2008). Le canal ASIC3 semble prépondérant dans la perception de la douleur acide cutanée car l'inhibition des canaux ASIC1a par la toxine PcTx1, n'a pas d'effet sur les modèles de douleur aiguë cutanée ou inflammatoire (Mazzuca et al, 2007), (Duan et al, 2007), (Deval et al, 2008) chez les rongeurs. Toutefois, on ne peut exclure l'implication des canaux ASIC1a dans les hétéromères ASIC1a/ASIC3, qui pourraient être exprimées en périphérie, et qui ne sont pas bloquées par la toxine PcTx1. Par ailleurs, la Mambalgine 1 a récemment permis de mettre en évidence l'implication d'ASIC1b, exprimé spécifiquement au niveau du système nerveux périphérique, dans la douleur cutanée thermique et inflammatoire (Diochot et al, 2012).

Les premières études, réalisées sur les souris invalidées pour l'un ou l'autre des gènes codant les protéines ASIC, ne suggéraient pas de rôle fondamental des ASIC dans la douleur cutanée. Au contraire, les données pharmacologiques, collectées chez les rats et l'Homme, ont révélé l'implication des canaux ASIC dans cette perception. En fait, les rôles de ces canaux diffèrent selon le modèle animal et les ASIC semblent avoir un rôle prépondérant chez les rats. D'ailleurs, l'activité électrophysiologique des canaux ASIC est supérieure dans

les neurones sensoriels de rats comparée à celle des neurones de souris (Deval et al, 2008). Les disparités entre rat et souris peuvent être expliquées par des mécanismes de compensation qui se mettent en place chez les animaux invalidés pour une sous-unité ASIC. En outre, ces différences peuvent être dues aux comportements divergents de ces deux espèces face à la douleur ou aux tests expérimentaux employés (Wilson & Mogil, 2001), (Mogil, 2009). Finalement, l'ensemble de ces données pourrait être le reflet du fait que les canaux ASIC sont présents, de manière basale, en plus faible quantité chez les souris que chez les rats. Ainsi, la surexpression des ASIC en condition inflammatoire génère des réponses accrues chez les rats, par rapport aux souris. Toutefois, chez les souris, la surexpression des ASIC lors des processus inflammatoires révèle des effets tardifs sur la douleur inflammatoire. En fait, partant d'un niveau d'expression des ASIC plus faible chez les souris, un certain temps serait nécessaire pour permettre l'augmentation de l'expression des protéines et révéler un phénotype. Cela expliquerait le rôle d'ASIC3 dans la phase tardive, et non dans la phase aiguë, de la douleur inflammatoire chez les souris (Yen et al, 2009), (Chen et al, 2002), (Price et al, 2001).

DOULEUR MUSCULAIRE ET ARTICULAIRE

Les douleurs musculaires et articulaires constituent un problème de santé majeur. La douleur musculaire ou musculo-squelettique affecte entre 60 et 85 % de la population. Elle est une des raisons les plus fréquentes de consultation médicale. Plus de 7 % des femmes, âgées entre 70 et 80 ans, souffrent de fibromyalgies (définies par l'IASP comme des douleurs chroniques généralisées sans cause identifiée) (Mense, 2008). D'autre part, parmi les affections articulaires, l'arthrose est la plus fréquente, avec une prévalence de 52 % dans la population adulte, pouvant atteindre 85 % pour les tranches d'âge les plus élevées. D'un point de vue clinique, l'arthrose, est la seconde cause d'invalidité (Maillefert et al, 2003).

Comme nous l'avons vu précédemment, les canaux ASIC, et notamment les canaux ASIC3, sont largement exprimés par les neurones sensoriels qui innervent les muscles et les articulations des rongeurs (Molliver et al, 2005), (Ikeuchi et al, 2009). De plus, l'expression des canaux ASIC2 et/ou ASIC3 au sein de ce système sensoriel est augmentée lors d'inflammations musculaires (Walder et al, 2010) et articulaires (Ikeuchi et al, 2009). Ainsi, l'étude de modèles animaux invalidés pour le gène ASIC3 a permis de montrer un rôle primordial de ces canaux dans les douleurs profondes musculaires et articulaires. Dans le modèle d'étude de Sluka et de ses collaborateurs, deux injections de solution saline acide (pH 4,0) sont effectuées à 5 jours d'intervalle dans le muscle gastrocnémien. Cette acidose musculaire produit une hypersensibilité mécanique cutanée au niveau plantaire, qui est bilatérale, de longue durée, et sans dommages tissulaires (Sluka et al, 2003). Cette hyperalgie secondaire à l'injection musculaire d'acide est abolie lors de l'inhibition d'ASIC3 par APETx2 (Karczewski et al, 2010) et ne se développe pas chez les animaux invalidés pour ASIC3 (Sluka et al, 2003). Au contraire, l'invalidation d'ASIC1 n'a pas d'effet (Sluka et al,

2003). De plus, l'injection de carragénine dans le muscle gastrocnémien, qui produit également une hyperalgie mécanique cutanée, est inexistante chez les souris invalidées pour ASIC3 (Sluka et al, 2007). Par surcroît, la réduction d'ASIC3 *in vivo* dans les fibres afférentes primaires qui innervent le muscle, empêche le développement de l'hyperalgie inflammatoire chez les souris sauvage (Walder et al, 2011). D'autre part, la restitution de l'expression d'ASIC3 dans les neurones sensoriels qui innervent la peau et les muscles, grâce à un vecteur viral, permet de restaurer l'hyperalgie mécanique de manière similaire à celle observée chez les souris de type sauvage. A noter également que, la délétion d'ASIC3 chez les souris mâles est à l'origine de fatigue musculaire, suggérant un rôle de ces protéines dans l'activité musculaire basale (Burnes et al, 2008). Les canaux ASIC1a participent de manière différente à la douleur musculaire. Ils contribueraient à l'hyperalgie primaire (Sluka et al, 2003) mais ne seraient pas impliqués dans l'hyperalgie mécanique secondaire qui se développe au delà du site touché par l'inflammation ou par l'acidose (Walder et al, 2010). En effet, les souris invalidées pour ASIC1a ne développent pas d'hyperalgie mécanique musculaire primaire mais développent une hyperalgie secondaire au niveau de la patte (Walder et al, 2010).

Au niveau articulaire, des modèles arthritiques sont générés chez les souris. Ils consistent à injecter de la carragénine dans l'articulation du genou (Ikeuchi et al, 2008; Ikeuchi et al, 2009). Ainsi, il a été montré que lors de l'inflammation, la chute de pH active les canaux ASIC3 dans les afférences primaires qui innervent l'articulation du genou. Cela conduit à une augmentation de l'activité nerveuse au niveau de la moelle épinière. Cette sensibilisation centrale générée est traduite par une hyperalgie secondaire au niveau de la patte (Ikeuchi et al, 2008), qui perdure plusieurs semaines (Ikeuchi et al, 2009). L'expression des canaux ASIC3 est augmentée de 50 % dans les neurones qui innervent les articulations du genou après l'inflammation articulaire. Ces différents résultats mettent en évidence le rôle d'ASIC3 dans l'hyperalgie mécanique secondaire (Ikeuchi et al, 2008). De manière intéressante, il a récemment été découvert que les canaux ASIC3 jouaient un rôle protecteur dans l'arthrite en limitant le processus inflammatoire, la destruction et les changements morphologiques de l'os. Effectivement, l'activation des canaux ASIC3 génère une douleur chez les souris. Les animaux réduisent alors instinctivement leur activité physique, ce qui minimise l'usure de l'articulation (Sluka et al, 2013).

L'ensemble de ces études atteste des rôles importants des ASIC au niveau périphérique, et plus particulièrement d'ASIC3, dans les douleurs issues des tissus profonds. La forte expression et l'activité du canal ASIC3 au sein des fibres afférentes primaires qui innervent la peau, les muscles et les articulations, lui confèrent un rôle capital dans les douleurs cutanées, musculaires et articulaires induites par l'acidose ou l'inflammation.

✓ DOULEUR VISCERALE

Parmi les douleurs viscérales, les douleurs abdominales chroniques touchent 15 à 25 % de la population. Elles sont constituées de spasmes ou distensions de la musculature viscérale, et sont en majorité d'origine fonctionnelle (absence d'altération structurelle, organique ou métabolique détectable par les examens cliniques actuels) (Camilleri, 2006). Le syndrome du côlon irritable fait partie de ces désordres fonctionnels. Dans les pays occidentaux, il affecte 18 % de la population, majoritairement des femmes, et peut dégrader considérablement la qualité de vie des patients (Camilleri et al, 2012).

Les douleurs thoraciques ne constituent qu'approximativement 1 % des visites chez le médecin. Toutefois, elles doivent être considérées avec vigilance car elles peuvent provenir de pathologies cardiaques, telles que l'angine de poitrine (douleur faisant suite à une ischémie myocardique), l'infarctus du myocarde, ou bien, être liées à des problèmes pulmonaires, comme une embolie ou une pneumonie par exemple (McConaghy & Oza, 2013).

DOULEUR GASTRO-INTESTINALE ET PERCEPTION MECANIQUE

Les canaux ASIC1a, ASIC2 et ASIC3 sont exprimés au niveau des afférences qui innervent le côlon, l'estomac et l'œsophage (Page et al, 2005). Les rôles de ces canaux au niveau des organes digestifs contrastent avec leurs rôles au niveau de la peau. En effet, si les rôles des ASIC sont plutôt subtils en ce qui concerne la perception mécanique cutanée (Price et al, 2000), (Price et al, 2001), (Page et al, 2004), ces canaux contribuent de manière notable à la perception mécanique gastro-intestinale (Page et al, 2005). Cela suggère que le ciblage pharmacologique des canaux ASIC pourrait avoir des effets différents et plus prononcés sur la sensibilité mécanique viscérale.

L'acidité gastrique contribue à la douleur de l'œsophage et de l'estomac (Wultsch et al, 2008). Chez les rats, tous les neurones sensoriels de DRG gastriques présentent un courant de type ASIC. Et les propriétés de ces courants sont altérées lors d'ulcères gastriques (Sugiura et al, 2005). L'administration d'acide dans l'estomac génère une hyperréactivité chez les souris invalidées pour ASIC2, qui est absente chez les animaux délétés pour ASIC3 (Wultsch et al, 2008). Ainsi, contrairement à ASIC2, le canal ASIC3 joue un rôle majeur dans l'hyperalgie acide associée à une gastrite expérimentale (Wultsch et al, 2008). Le canal ASIC1a semble également jouer un rôle dans la fonction gastrique puisque l'invalidation de ce canal chez la souris conduit à une augmentation de la sensibilité mécanique dans tous les sous-types de mécanorécepteurs coliques et gastro-œsophagiens (Page et al, 2004).

Chez l'Homme, les canaux ASIC1, ASIC2 et ASIC3 sont exprimés dans l'intestin et au niveau des neurones sensoriels de petit diamètre (nocicepteurs) (Yiangou et al, 2001b). Les tissus intestinaux enflammés (maladie de Crohn), présentent une augmentation des transcrits d'ASIC3 ainsi qu'une élévation du nombre de neurones exprimant ASIC3 dans les

plexus myentérique et sous-muqueux (Yiangou et al, 2001b). Au niveau des afférences sensorielles du côlon de souris, les transcrits ASIC3 sont les plus abondants, suivis d'ASIC1, puis d'ASIC2 (Hughes et al, 2007). La comparaison des souris invalidées pour les trois types de canaux a révélé un rôle primordial d'ASIC3 dans la sensibilité mécanique au niveau des afférences viscérales (Page et al, 2005). Au contraire, ASIC1a semble avoir une contribution « négative », puisque les souris invalidées pour ce canal ont une hypersensibilité face aux stimulations mécaniques (Page et al, 2005). Enfin, le rôle des canaux ASIC2 dans cette sensibilité mécanique viscérale n'est pas clair. Il diffère selon les sous-classes d'afférences sensorielles et les régions de l'intestin (Page et al, 2005). D'autant plus que la nociception viscérale mécanique, induite par une distension, n'est pas affectée chez les souris invalidées pour ASIC2 (Roza et al, 2004). Toutefois, la forte prévalence d'ASIC3 dans les neurones qui innervent le côlon supporte les études électrophysiologiques qui montrent sa contribution majoritaire dans la transduction mécanique intestinale. De plus, seuls les canaux ASIC3, sont surexprimés dans des pathologies inflammatoires comme la maladie de Crohn. Ce qui suggère un rôle des canaux ASIC3 dans les douleurs liées à des problèmes de motilité dans les pathologies intestinales (Yiangou et al, 2001b). Ces résultats sont en accord avec la contribution d'ASIC3 dans la détection des stimuli mécaniques nocifs dans le côlon chez la souris (Jones et al, 2005). Ainsi, les canaux ASIC, et principalement ASIC3, représentent de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement des douleurs intestinales.

DOULEUR CARDIAQUE ET PULMONAIRE

Les neurones sensoriels qui innervent le cœur, localisés dans les ganglions noueux et rachidiens, expriment un fort niveau de canaux ASIC (Benson et al, 1999). Ceux-ci joueraient un rôle dans la perception de l'acidose qui se produit lors d'une ischémie cardiaque et conduit à l'angine de poitrine (Benson et al, 1999). Les canaux recombinants ASIC3 et ASIC3/ASIC2b reproduisent les caractéristiques fonctionnelles des courants natifs retrouvés dans les afférences cardiaques lors d'une stimulation acide (Sutherland et al, 2001). Ces canaux seraient les senseurs de l'acidose ischémique qui se produit quelques minutes après une crise cardiaque. En effet, dans ces conditions pathologiques, les valeurs de pH se situent aux alentours de 7,0 et correspondent à la gamme d'activation des canaux ASIC3. De plus, dans les neurones sensoriels cardiaques des DRG de rat, il existe un courant soutenu lorsque le pH passe de 7,4 à 7,0. Ce courant est caractéristique du courant de fenêtre des canaux exprimant ASIC3 (Yagi et al, 2006), (Hattori et al, 2009). Le canal ASIC3 apparaît donc comme un élément clé dans la douleur cardiaque, et il pourrait être ciblé pharmacologiquement pour traiter la douleur due à l'angine de poitrine ou les autres douleurs ischémiques (Sutherland et al, 2001), (Yagi et al, 2006). Par ailleurs, de manière intéressante, l'acide lactique, qui est produit lors d'ischémie myocardique, et qui serait impliqué dans la douleur de l'angine de poitrine, potentialise fortement l'activité du canal ASIC3 (Immke & McCleskey, 2001a).

Des courants de type ASIC ont été enregistrés dans les neurones sensoriels du nerf vague innervant les poumons chez le rat (Gu & Lee, 2006). De plus, chez le rat, il a été montré qu'ASIC3 est exprimé dans les ganglions sensoriels vague et glossopharyngien (Fukuda et al, 2006), ainsi que dans les neurones de DRG afférents projetant dans les poumons et la plèvre (Groth et al, 2006). Lors du réflexe de toux, généré le plus souvent par des stimuli mécaniques, des agents chimiques ou des solutions acides, on constate des décharges de potentiels d'action dans le nerf vague (Kollarik & Undem, 2002). Or, une étude sur le cochon d'inde a montré l'activation des canaux ASIC et TRPV1 dans les afférences qui innervent les voies aériennes, lors d'une acidose (Kollarik & Undem, 2002). Les canaux ASIC participent donc à la réponse des voies aériennes face à l'acidification tissulaire, associée à des conditions physiologiques et physiopathologiques (toux, broncho-constriction…) (Canning, 2006).

b. ROLES DANS LA MODULATION CENTRALE DE LA DOULEUR

Les canaux ASIC1a et ASIC2, largement exprimés dans les neurones spinaux de second ordre qui reçoivent les signaux des afférences primaires, voient leur expression augmentée en cas d'inflammation périphérique (Duan et al, 2007), (Wu et al, 2004). Ils jouent un rôle dans le traitement des stimulations nocives et dans le développement d'hyperalgie ou d'allodynie associés à la douleur chronique (Baron et al, 2008), (Duan et al, 2007), (Wu et al, 2004). Il a d'ailleurs été démontré qu'ASIC1a serait l'acteur majoritaire dans ces mécanismes (Duan et al, 2007). ASIC1a aurait un rôle primordial dans la plasticité neuronale centrale (Wemmie et al, 2002), (Wemmie et al, 2003) et dans les mécanismes de régulation de la douleur dans la moelle épinière (Mazzuca et al, 2007), (Diochot et al, 2012). Les canaux ASIC1a sont impliqués dans la voie de la douleur liée aux enképhalines endogènes (Mazzuca et al, 2007). En effet, le blocage de ces canaux par PcTx1, conduit à une analgésie qui est supprimée lors de l'inhibition des récepteurs aux opioïdes et qui est perdue chez les souris qui n'expriment pas d'enképhalines (Mazzuca et al, 2007). En fait, le blocage des canaux ASIC1a augmente le niveau d'enképhalines dans le fluide cérébrospinal et entraîne d'importants effets analgésiques (Mazzuca et al, 2007). De plus, une étude récente, effectuée au laboratoire, a mis en évidence le rôle des canaux homomériques ASIC1a/ASIC2a au niveau de la moelle (Diochot et al, 2012). Ces données sont particulièrement intéressantes puisqu'elles impliquent les canaux ASIC spinaux dans une voie de la douleur indépendante des opioïdes (**Figure 17**). En effet, l'inhibition des courants ASIC1a/ASIC2a spinaux par la Mamb-1, réduit les douleurs thermique et inflammatoire chez les souris de manière aussi forte que la morphine.

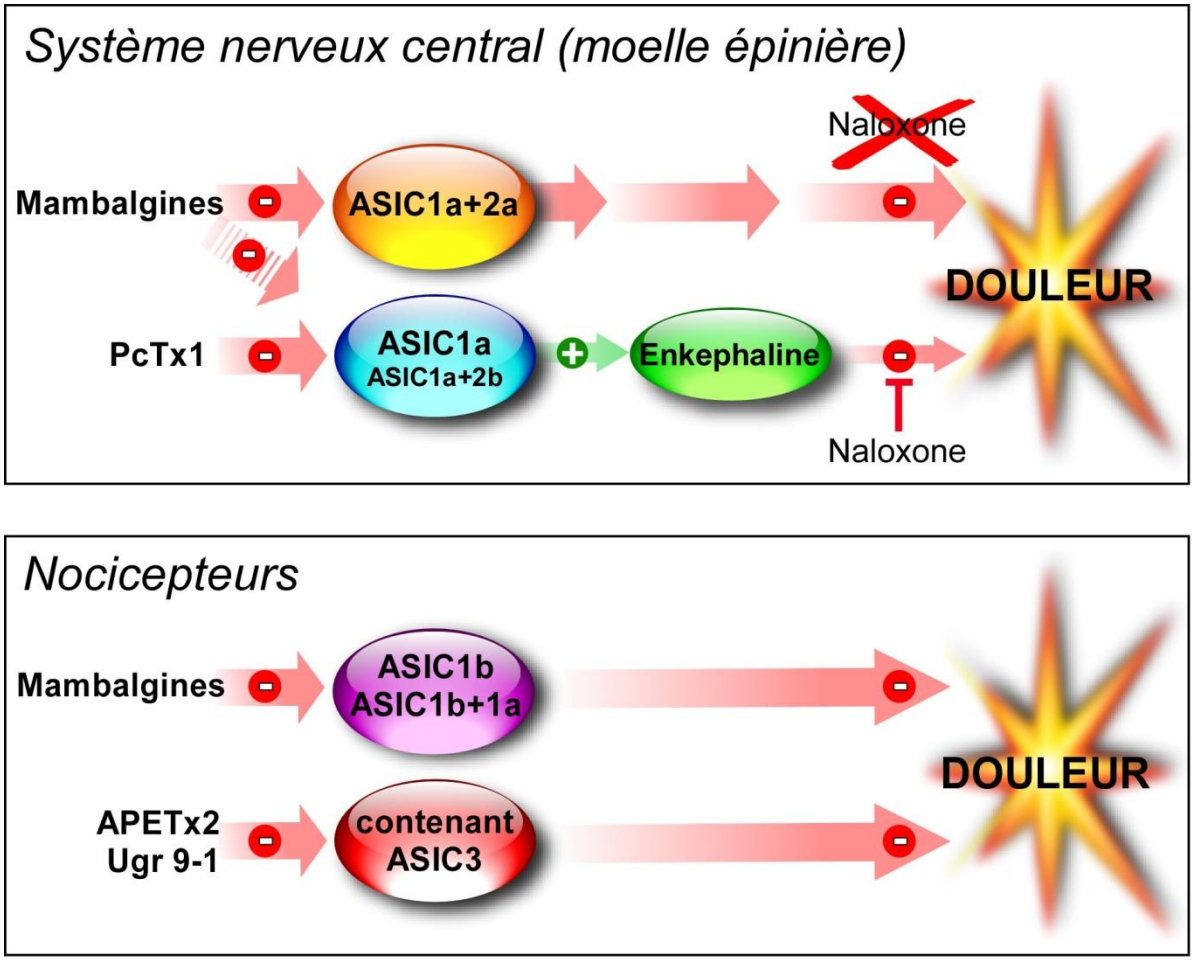


Figure 17 : Effets des différentes toxines animales sur les canaux ASIC homo ou hétéromériques au niveau central et périphérique.

Au niveau du système nerveux central : *Les Mambalgines inhibent les canaux hétéromériques ASIC1a/ASIC2a, ASIC1a/ASIC2b et les canaux homomériques ASIC1a. Cela a permis de mettre en évidence l'implication de ces canaux dans la douleur, via une voie indépendante des opioïdes. La PcTx1 réduit l'activité des canaux hétéromériques ASIC1a/ASIC2b et homomériques ASIC1a démontrant les rôles de ceux-ci dans la douleur, via une activation des enképhalines.*

Au niveau des nocicepteurs périphériques : *Les Mambalgines bloquent les canaux homomériques ASIC1b et hétéromériques contenant ASIC1b/ASIC1a, dévoilant un effet de ces canaux sur la douleur périphérique. La toxine APETx2 et la toxine récemment isolée Ugr 9-1 sont des inhibiteurs des canaux ASIC3. Elles ont démontré les rôles de ces canaux dans différents types de douleurs périphériques.*

CONTEXTE DE L'ETUDE EXPERIMENTALE

Les canaux ASIC sont des canaux ioniques, dépolarisants, excitateurs, activés par les protons (Waldmann et al, 1997b). Ils ont ainsi émergé depuis plusieurs années comme des senseurs particulièrement importants pour les douleurs associées à des acidoses tissulaires (Steen et al, 1995a), (Ugawa et al, 2002), (Jones et al, 2004). De nombreuses pathologies telles que l'ischémie, les incisions, certaines tumeurs, génèrent une acidification extracellulaire (Woo et al, 2004), (Mantyh et al, 2002). Parmi les ASIC, le canal ASIC3 est spécifique du système nerveux périphérique chez les rongeurs (Waldmann et al, 1997a). Il est largement exprimé dans les neurones sensoriels de rats (Molliver et al, 2005), (Voilley et al, 2001). D'autre part, les canaux ASIC3 sont des candidats extrêmement intéressants pour la perception de la douleur non-adaptative causée par l'acidose. En effet, ces canaux sont très sensibles aux protons. Ils sont activés par de faibles diminutions du pH extracellulaire (de pH 7,4 à pH 7,2) qui correspondent précisément à la gamme de pH retrouvée après une incision tissulaire, par exemple. Par ailleurs, le canal ASIC3 a la particularité de générer un courant soutenu en réponse à l'acidose modérée (pH 7,0). Ce courant persiste tant que l'acidose subsiste au sein du tissu, engendrant une dépolarisation constante. Cette sensibilisation pourrait être à l'origine de douleurs non-adaptatives qui se chronicisent. De surcroît, le canal ASIC3 est capable d'intégrer différents stimuli inflammatoires ou ischémiques comme les protons (Waldmann et al, 1997a), l'ATP (Birdsong et al, 2010), l'acide lactique (Immke & McCleskey, 2001b), l'acide arachidonique (Smith et al, 2007), (Deval et al, 2008), l'hypertonicité (Deval et al, 2008) et l'agmatine (Li et al, 2010). D'ailleurs, ces canaux sont impliqués dans différents types de douleurs, comme les douleurs cutanées, acide (Deval et al, 2008) et inflammatoire (Deval et al, 2008), (Yen et al, 2009), les douleurs musculaires et articulaires, où ils contribuent à l'hyperalgie mécanique primaire et/ou secondaire après une inflammation ou une lésion (Sluka et al, 2009), (Price et al, 2001), (Sluka et al, 2007), et enfin, dans la nociception mécanique (Price et al, 2001), (Jones et al, 2005), (Page et al, 2005), (Fromy et al, 2012) et la perception acide viscérale (Wultsch et al, 2008).

Ainsi, parmi les ASIC, le canal ASIC3 semble primordial pour la perception des douleurs liées à des acidoses faibles, des processus inflammatoires, et pour la sensibilisation des neurones sensoriels. Ces différentes caractéristiques font qu'ASIC3 pourrait être à l'origine des douleurs chroniques, actuellement difficiles à traiter. C'est pourquoi, lors de la thèse, je me suis intéressée aux rôles du canal ASIC3 dans un modèle de douleur post-opératoire, qui fait intervenir des gammes de pH compatibles avec son activation ainsi que des médiateurs inflammatoires. D'autre part, on sait que le canal ASIC3 est potentialisé par des médiateurs de l'inflammation (Deval et al, 2008), (Li et al, 2010). Et, si jusqu'ici, on pensait que les régulations d'ASIC3 nécessitaient la présence de protons, il a été prouvé récemment qu'un ligand endogène, en absence d'acidose, était capable d'activer le canal (Li et al, 2010). Alors, nous nous sommes demandé si des médiateurs de l'inflammation pouvaient activer directement les canaux ASIC3 en conditions physiologiques de pH.

Toutefois, l'ensemble des connaissances sur les canaux ASIC3 porte essentiellement sur l'isoforme de rongeurs. Et, bien que la protéine humaine soit similaire à 84 % à la protéine de rongeur (de Weille et al, 1998), on peut se demander si le canal ASIC3 humain présente des caractéristiques ou des rôles particuliers. D'autant que des études comportementales, réalisées sur l'Homme, ont mis en évidence un rôle des ASIC dans la douleur acide cutanée (Jones et al, 2004), (Ugawa et al, 2002).

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Lors de ma thèse, je me suis intéressée aux rôles et aux régulations des canaux ioniques ASIC, principalement les canaux ASIC3, impliqués dans les processus douloureux.

Dans un premier temps, j'ai participé à l'étude du rôle d'ASIC3 dans la douleur post-opératoire, utilisant notamment un nouveau test comportemental pour évaluer la douleur de posture chez les animaux. Dans un deuxième temps, j'ai étudié les propriétés du canal ASIC3 humain et j'ai mis en évidence une propriété originale qui lui confère une sensibilité, non seulement à l'acidité, mais également à l'alcalinisation extracellulaire. Enfin, dans la dernière partie de ma thèse, j'ai mis en évidence les effets d'un lipide, issu de la dégradation membranaire, sur ASIC3. J'ai montré, pour la première fois, l'activation directe du canal par un lipide inflammatoire endogène, en absence de protons, et sa participation à une douleur spontanée chez les rats.

A. IMPLICATION DU CANAL ASIC3 DANS LA DOULEUR POST-OPERATOIRE CHEZ LE RAT

1. CONTEXTE DE L'ETUDE

Les canaux ASIC3 sont extrêmement sensibles aux protons. Ils sont activés pour de faibles diminutions du pH extracellulaire, compatibles avec les acidifications tissulaires qui accompagnent les douleurs post-opératoires (Woo et al, 2004). Ainsi, nous nous sommes intéressés aux rôles que pouvaient avoir ces canaux ASIC3 dans les douleurs consécutives à un acte chirurgical. D'autant plus que les douleurs post-opératoires sont à l'origine de nombreuses douleurs chroniques difficiles à traiter. En effet, si les douleurs chroniques affectent environ 20 % de la population adulte, et jusqu'à 50 % de la population âgée, celles dues à des séquelles d'intervention chirurgicale, ont longtemps été sous-estimées par le corps médical, mais auraient une incidence globale estimée à 30 %. Ces douleurs chroniques post-opératoires sont donc un véritable enjeu de santé publique. Elles se caractérisent par des douleurs spontanées sans aucune stimulation, ou des douleurs évoquées faisant suite à un stimulus. Ces douleurs sont localisées au niveau du site opéré ou bien au-delà de ce site. Les douleurs post-opératoires font intervenir des mécanismes différents des autres types de douleurs chroniques. Elles sont encore mal comprises et les analgésiques actuels sont souvent inefficaces. Plusieurs modèles animaux d'incision sont utilisés pour étudier la physiopathologie de la douleur post-opératoire. C'est le docteur Brennan et ses collaborateurs, qui pour la première fois, développèrent et caractérisèrent un modèle d'incision douloureuse chez le rat (Brennan et al, 1996). Ce modèle, que nous avons utilisé dans notre étude, consiste en une incision longitudinale de 1 cm de la peau et du fascia de la face plantaire de la patte d'un rat anesthésié. Cette entaille débute à partir de 0,5 cm du bord proximal du talon et s'étend vers le milieu de la patte (**Figure 18, A**). Le muscle plantaire est ensuite soulevé et incisé dans le sens de la longueur, en prêtant attention de ne pas léser l'insertion musculaire (**Figure 18, B**). Après l'hémostase, deux sutures sont réalisées au niveau cutané afin de refermer la plaie (**Figure 18, C**). Le réveil des animaux est contrôlé et les tests douloureux sont effectués 4 à 24 h après l'acte chirurgical. L'incision est cicatrisée au bout de 5 jours (**Figure 18, D**).

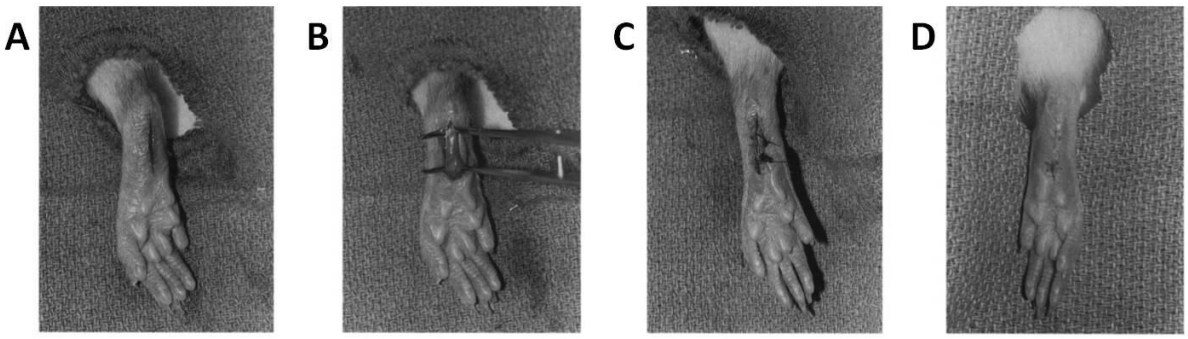


Figure 18 : Photographies des différentes étapes de la chirurgie plantaire sur un rat anesthésié, selon le modèle de Brennan.

(D'après (Brennan et al, 1996))

A: Une incision longitudinale de 1 cm est réalisée à travers la peau et le fascia 0,5 cm à partir du bord proximal du talon et s'étendant vers le milieu du pied.
B: Le muscle plantaire est élevé et incisé longitudinalement.
C: Après l'hémostase, la plaie est refermée par deux sutures au niveau du plan cutané.
D: L'incision est cicatrisée au bout de 5 jours.

Le modèle d'incision plantaire de Brennan induit des douleurs évoquées et non évoquées, en accord avec les constatations cliniques (Pogatzki-Zahn et al, 2007). Dans cette douleur chirurgicale, il est proposé l'existence de sensibilisations périphériques et centrales qui contribuent au développement et au maintien de la douleur (Pogatzki-Zahn et al, 2007). Ces douleurs seraient dues à différents facteurs, impliquant la lésion de la peau, des muscles, mais également la lésion de nerfs innervant les tissus opérés, et l'inflammation qui se déclenche de manière secondaire (Flatters, 2008), (Pogatzki-Zahn et al, 2007). De plus, l'intérêt particulier des modèles d'incision chirurgicale est dû au fait qu'il existe une réduction du pH au sein du site lésé (Woo et al, 2004). Ainsi, lors d'une incision de la peau au niveau plantaire, le pH est réduit de pH 7,13 à pH 6,89. Dans un autre modèle, consistant en une lésion du muscle gastrocnémien, le pH passe de 7,14 à 6,54, 10 minutes après l'opération. Ces réductions du pH sont localisées au sein du tissu lésé et sont maintenues durant plusieurs jours. Les comportements douloureux sont corrélés avec l'abaissement du pH tissulaire. Ces études suggèrent que les canaux activés par les protons, tels que les ASIC et TRPV1, dans les neurones afférents primaires, puissent être impliqués dans la douleur post-opératoire.

Connaissant la grande sensibilité aux protons du canal ASIC3, activé dans une gamme de pH proche des variations qui ont lieu au sein des tissus incisés (Woo et al, 2004), sa particularité à développer un courant soutenu, et sa capacité à intégrer divers médiateurs inflammatoires, nous avons étudié le rôle de ce canal dans la détection et la transmission de la douleur post-opératoire.

Nous avons mesuré les douleurs évoquées au chaud et, en accord avec les problèmes rencontrés en clinique, nous avons examiné les comportements douloureux spontanés et posturaux. L'hyperalgie au chaud est évaluée par un test de chaleur radiante (« Hargreaves test »). Les animaux sont placés dans des cages surélevées et la source de chaleur est appliquée sous les pattes, au niveau de la zone opérée. Le temps de latence est mesuré du côté de la lésion (ipsilatéral) et du côté non opéré (contra-latéral) 4 h après l'incision. La douleur spontanée est mesurée par comptage du nombre de levers de la patte opérée des rats (« flinching test »). Les animaux vigiles sont placés dans des cages transparentes et le comportement douloureux spontané est analysé durant une période de 5 min. Enfin, dans cette étude, nous avons utilisé un nouveau test, qui permet d'évaluer le comportement postural des animaux. Ce test consiste à mesurer l'équilibre postural des rats libres de leurs mouvements (« dynamic weight bearing test »). Les rats sont placés dans des cages transparentes, sur un tapis recouvert de capteurs de poids calibrés. Les capteurs mesurent la répartition du poids exercé par chacune des quatre pattes de l'animal sur une période de 5 minutes. Les animaux naïfs équilibrent le poids de leur corps sur chacune des pattes arrière, alors qu'une différence de la distribution du poids reflète un comportement douloureux.

Ces premiers travaux réalisés au cours de ma thèse avaient les objectifs suivants :

- **Comprendre le rôle des ASIC dans la douleur post-opératoire**
- **Caractériser et distinguer le rôle spécifique d'ASIC3**
- **Etudier plus particulièrement la douleur posturale, proche des problèmes évoqués en clinique, par l'utilisation d'un nouveau test comportemental le *« Dynamic weight bearing »***

2. ARTICLE

“Acid-sensing ion channels in postoperative pain”.
(Les canaux ioniques sensibles à l’acide dans la douleur post-opératoire.)

Emmanuel Deval, Jacques Noël, Xavier Gasull, Anne Delaunay, Abdelkrim Alloui, Valérie Friend, Alain Eschalier, Michel Lazdunski et Eric Lingueglia.

Cellular/Molecular

Acid-Sensing Ion Channels in Postoperative Pain

Emmanuel Deval,[1] Jacques Noël,[1] Xavier Gasull,[1,2] Anne Delaunay,[1] Abdelkrim Alloui,[3,4] Valérie Friend,[1] Alain Eschalier,[3,4] Michel Lazdunski,[1] and Eric Lingueglia[1]

[1]Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Unité Mixte de Recherche 6097 Centre National de la Recherche Scientifique/Université de Nice-Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, France, [2]Laboratory Neurophysiology, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona-Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, 08036 Barcelona, Spain, [3]Inserm, U 766, F-63001 Clermont-Ferrand, France, and [4]Clermont Université, Université d'Auvergne, Pharmacologie fondamentale et clinique de la douleur, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

Iatrogenic pain consecutive to a large number of surgical procedures has become a growing health concern. The etiology and pathophysiology of postoperative pain are still poorly understood, but hydrogen ions appear to be important in this process. We have investigated the role of peripheral acid-sensing ion channels (ASICs), which form depolarizing channels activated by extracellular protons, in a rat model of postoperative pain (i.e., hindpaw skin/muscle incision). We report high levels of ASIC-type currents (~77%) in sensory neurons innervating the hindpaw muscles, with a prevalence of ASIC3-like currents. The ASIC3 protein is largely expressed in lumbar DRG neurons innervating the plantar muscle, and its mRNA and protein levels are increased by plantar incision 24 h after surgery. Pharmacological inhibition of ASIC3 channels with the specific toxin APETx2 or *in vivo* knockdown of ASIC3 subunit by small interfering RNA led to a significant reduction of postoperative spontaneous, thermal, and postural pain behaviors (spontaneous flinching, heat hyperalgesia, and weight bearing). ASIC3 appears to have an important role in deep tissue but also affects prolonged pain evoked by skin incision alone. The specific homomeric ASIC1a blocker PcTx1 has no effect on spontaneous flinching, when applied peripherally. Together, these data demonstrate a significant role for peripheral ASIC3-containing channels in postoperative pain.

Introduction

Pain caused by surgical procedures is a significant clinical problem. Persistent postoperative pain occurs in patients undergoing thoracotomy, coronary artery bypass surgery, inguinal hernia repair, cesarean section, limb amputations, and breast, gallbladder, or lung surgeries (for review, see Perkins and Kehlet, 2000; Bove et al., 2009). Patients report both resting and evoked pain, the latter being caused by coughing, movement, or pressure application on or near the wound (Moiniche et al., 1997). Intensity of acute postoperative pain is a predictor of chronic pain (Perkins and Kehlet, 2000) and often complicates the recovery process after surgery (Pavlin et al., 2002), prolonging hospitalization, predisposing patients to greater morbidity, and increasing stress (Wu et al., 2003; Duarte et al., 2005). Optimizing pain management after surgery is thus important to enhance patient comfort and expedite recovery.

The etiology of postoperative pain is still poorly understood, and the mechanisms involved are probably multiple, including tissue injury related to the incision itself, secondary inflammation, and damage to nerves caused by tissue retraction during the surgery (Flatters, 2008). The mechanisms of postincisional nociception are distinct from other pain conditions (Pogatzki-Zahn et al., 2007). Hydrogen ions appear as key mediators in this process, and local decrease of tissue pH is correlated with pain behaviors in rat models of surgical pain stemming from skin and/or muscle incision (Woo et al., 2004). The transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channel has been reported to contribute to heat hypersensitivity after plantar incision in mice (Banik and Brennan, 2009). On the other hand, nonselective or non-subtype-specific inhibitors of acid-sensing ion channels (ASICs), such as amiloride and A-317567, have also suggested a possible implication of these channels in postoperative pain (Dubé et al., 2005). ASICs form a family of voltage-independent cation channels activated by extracellular acidification and expressed by nociceptors (Waldmann et al., 1997a,b; Chen et al., 1998; Bässler et al., 2001).

In the present work, we have investigated the role of peripheral ASICs in rat postoperative pain developed following hindpaw skin/muscle incision (Brennan et al., 1996). We report high levels of ASIC3-type currents and a large expression of the protein in lumbar DRG neurons innervating the rat hindpaw muscles. Plantar incision is associated with an increase in ASIC3 mRNA level and protein expression in lumbar sensory neurons. The pharmacological blockade of ASIC3 with the specific sea anemone toxin APETx2 (Diochot et al., 2004) and the *in vivo* knockdown of ASIC3 expression with a specific small interfering RNA (siRNA) (Deval et al., 2008) both led to a significant reduction of postoperative pain behaviors, supporting the implication of peripheral ASIC3 in postoperative pain.

Received Oct. 4, 2010; revised Feb. 7, 2011; accepted Feb. 26, 2011.

Author contributions: E.D., J.N., and E.L. designed research; E.D., J.N., X.G., A.D., A.A., V.F., and E.L. performed research; E.D., X.G., A.D., and E.L. analyzed data; E.D., A.E., M.L., and E.L. wrote the paper.

We thank Drs. Anne Baron, Sylvie Diochot, and Miguel Salinas for helpful discussion, and C. Chevance for secretarial assistance. We thank the Association Française contre les Myopathies, the Agence Nationale de la Recherche, the Institut UPSA de la Douleur, the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Fondation pour la Recherche Médicale, and Grant FIS08/0014 (from Institut Salud Carlos III, Spain) for financial support.

The authors declare no conflict of interest.

Correspondence should be addressed to Emmanuel Deval at the above address. E-mail: deval@ipmc.cnrs.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.5266-10.2011

Copyright © 2011 the authors 0270-6474/11/316059-08$15.00/0

Materials and Methods

Primary culture of labeled dorsal root ganglia neurons. Lumbar (L3-L6) DRGs were dissected bilaterally from adult male Wistar rats previously injected intramuscularly with the retrograde fluorescent dye DiI (5 × 1 μl into hindpaw muscles). After an enzymatic dissociation with 0.1% collagenase, neurons were then plated on collagen-coated 35 mm Petri dishes (Biocoat) and maintained in culture at 37°C (95% air/5% CO_2) in DMEM containing 5% fetal calf serum. Electrophysiological experiments were performed 1–8 d after plating. Culture media were changed 1 d after plating and then every 3 d of culture by replacing half the media. ASIC currents were only considered when their amplitude was larger than 30 pA. The culture conditions did not dramatically change the properties of ASIC-like currents. A total of 33.3% of the cells (7 of 21 neurons) have been used 1–2 d after plating, and 66.7% (14 of 21 neurons) have been used >2 d after plating (between 3 and 8 d). A total of 71.4% of 1–2-d-old neurons (5 of 7 neurons) and 78.6% of older neurons (11 of 14 neurons) presented pH 6.6-evoked ASIC-like current, with 20 and 18.2% of type 1 current, and 80 and 72.7% of type 2 current, respectively. One neuron in the older population expressed an ASIC-type current partly inhibited by the PcTx1 toxin and with an intermediate inactivation rate that was not classified as type 1 or type 2.

Electrophysiology. We used the whole-cell configuration of the patch-clamp technique to measure membrane currents (voltage-clamp) or membrane potentials (current-clamp). Recordings were made at room temperature using an RK-400 amplifier (Bio-Logic Science Instruments) with a 3 kHz low-pass filter (Krohn-Hite). Data were sampled at 10 kHz, digitized by a Digidata 1322A A-D/D-A converter (Molecular Devices), and recorded on a hard disk using pClamp software (version 9; Molecular Devices). Patch pipettes (1–4 MΩ) contained the following (in mM): 135 KCl, 2.5 Na_2-ATP, 2 $MgCl_2$, 2.1 $CaCl_2$, 5 EGTA, 10 HEPES, pH 7.25 with KOH. Various pH-buffered solutions and drugs of interest were applied to individual patch-clamped cells using a homemade microperfusion system driven by microsolenoid valves (Sirai) allowing rapid solution changes. The control bath solution contained the following (in mM): 145 NaCl, 5 KCl, 2 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$, 10 HEPES, pH 7.4 with NaOH. ASIC currents were induced by shifting one of eight outlets of the microperfusion system from the pH 7.4 control solution to an acidic test solution. For the experiments performed on cultured DRG neurons, glucose (10 mM) was added to the control bath solution.

Quantitative RT-PCR experiments. Changes in rat ASIC3 expression in the postoperative pain model were evaluated in lumbar dorsal root ganglia by reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) 24 h after surgery. L4–L6 ganglia from both sides of the animal were removed, RNA was extracted with the RNeasy micro kit (Qiagen), and cDNA was prepared with cloned AMV First-Strand cDNA synthesis kit (Invitrogen) and used for qPCR in a Light-Cycler480 (Roche Products). ASIC3 expression was compared between ipsilateral and contralateral sides for the postoperative pain model and for naive animals that did not have any surgery. Primers used are as follows: 18S aagtccctgccctttgtacaca/gatccgagggcctcactaaac; and ASIC3 cacccaatgacttgcactgg/taggcagcatgttcagcagg. For each animal, ASIC3 expression was normalized against 18S and converted to fold induction relative to the contralateral side.

Retrograde labeling of hindpaw muscle afferents and immunohistochemistry. Dorsal root ganglion neurons innervating the plantar hindpaw muscle in male Wistar rats (8–11 weeks) were labeled by intramuscular injections of 3 × 2 μl of the fluorescent dye fast blue (Polysciences) at a concentration of 2% in saline. Dye was injected 2 weeks before killing the rats, and lumbar (L5) DRGs were removed and processed for immunohistochemistry. Freshly isolated DRGs were embedded in Tissue-Tek compound (Sakura Finetek, Bayer Diagnostic) and rapidly frozen in isopentane cooled by liquid nitrogen. Cryostat sections (12 μm thickness) were then prepared. Sections were fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% Tween 20, and blocked with 2% horse serum before overnight incubation at 4°C with an anti-ASIC3 rabbit polyclonal antibody (1:400; Alomone Labs) followed by a goat anti-rabbit Alexa 594 secondary antibody (1:200; Invitrogen). Specificity of the primary antibody was previously confirmed on ASIC3 knock-out mice (Ikeuchi et al., 2009) and on the recombinant channel (data not shown). Staining was visualized using an Axiovert 200M microscope (Carl Zeiss). Fast blue-labeled neurons were identified by their blue fluorescence following exposure to ultraviolet light at 350 nm. The images were analyzed with ImageJ software (National Institutes of Health). ASIC3 expression was quantified as the percentage of total fast blue-positive neurons. Consecutive slices were not used to avoid double counting.

Animal handling and plantar incisional pain model. Adult male Wistar rats (Charles River) were housed with *ad libitum* access to food and water, in a temperature-controlled room with a 12 h light/dark cycle, at least 1 week before the surgical procedure. The plantar incisional pain model was then operated as initially described by Brennan et al. (1996). Rats were anesthetized with isoflurane 2.5%, and the skin of the operated foot was sterilized with povidone iodine 10% (Merck) and placed in the hole of a sterile drape. A 1 cm longitudinal incision was made through skin and fascia of the plantar face of a hindpaw, starting at 0.5 cm from the proximal edge of the heel. The plantar muscle was then elevated with forceps and incised longitudinally with the blade keeping attention to leave muscle origins intact. After hemostasis, the wound was apposed with two sutures of 5/0 polyamide monofilament (Filapeau, Peters Surgical). Vehicle (20 μl of NaCl 0.9%), APETx2 (20 μl at 20 μM), or PcTx1 (20 μl at 120 nM) was applied directly to the wounds using a micropipette just before the second suture was made. The concentrations of APETx2 and PCTx1 used correspond to six times the concentrations that produce the maximal inhibitory effects on recombinant ASIC3 and ASIC1a currents, respectively. For recovery from anesthesia, animals were placed in new cages with special nonabrasive dry litter (Litaspen Premium, SPPS). Behavioral pain tests were performed 4 and 24 h after surgery.

Intrathecal injection of siRNA. Ten microliters of a siRNA (2 μg)/i-Fect (Neuromics) mix was injected intrathecally between the L4 and L5 vertebrae of rats using a Hamilton syringe and a 25 gauge needle. Animals received one injection per day for 4 d (Fig. 4*A*, protocol). ASIC3 (CUACACGCUAUGCCAAGGAdtdt) and the corresponding scramble (GCUCACACUACGCAGAGAUdtdt) siRNAs have been previously described (Deval et al., 2008).

Behavioral pain tests. Spontaneous postoperative pain was assessed by counting the number of spontaneous flinches of the operated paw (flinching test). Rats were placed in transparent plastic boxes, and the number of flinches was counted over a period of 5 min.

Thermal hyperalgesia was measured with the radiant heat test (Bioseb). Rats were placed in transparent plastic boxes on an elevated floor. A radiant heat source was then placed under one animal foot and maintained until the rat lifted its foot.

A dynamic weight-bearing test (Bioseb) measures the postural equilibrium on freely moving rats. The rats were placed in a transparent chamber (30 × 30 cm) on a calibrated weight transducer pad. Animals were moving freely in the chamber, and the transducer measured the repartition of the rat's average body weight on each paw over a 5 min time period. Naive rats equilibrate equally their body weight on each hindpaw, and a difference of weight distribution reflects pain experienced by rats. The weight-bearing difference was calculated as the absolute value of the difference between the weights on the two hindpaws.

Statistical analysis. Data are presented as the mean ± SEM. Statistical differences between different sets of data were assessed by performing parametric or nonparametric tests where appropriate (see figure legends).

Results

ASIC-type currents activated by moderate acidifications in sensory neurons innervating the hindpaw muscles of the rat

ASIC channel functional properties were evaluated in rat DRG neurons innervating the hindpaw muscles identified by retrograde labeling with the fluorescent dye DiI. Whole-cell voltage-clamp currents evoked by extracellular acidification from a resting pH 7.4 to a test pH 6.6 were recorded. The value for the test pH 6.6 was chosen because it corresponds to the tissue pH measured *in vivo* in rat muscle incision models of postoperative pain (Woo et al., 2004). We found that 77 ± 13% of the sensory

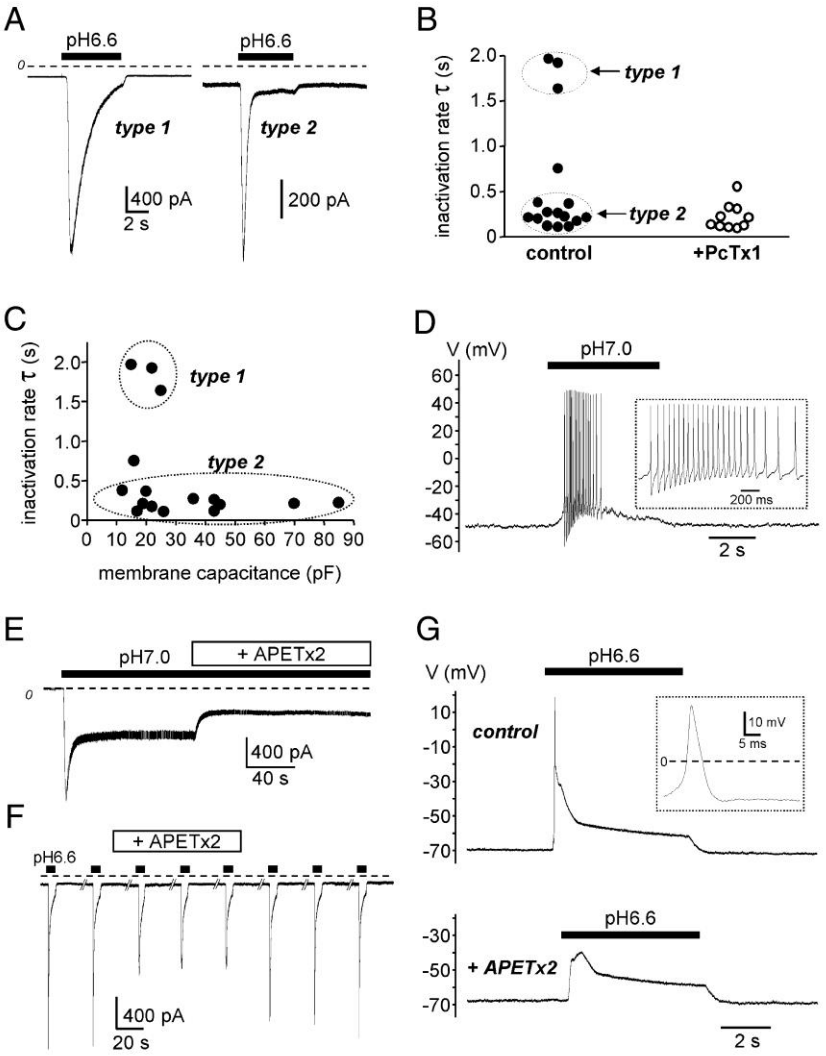


Figure 1. Electrophysiological characterization of ASIC channels in DRG neurons innervating the rat hindpaw muscles. ***A***, Typical ASIC currents recorded in voltage-clamp (holding potential −80 mV) from retrogradely labeled sensory neurons innervating hindpaw muscles. Current was activated by a rapid switch of the external pH from 7.4 to 6.6, as indicated by the black bars above the current traces. The dashed line represents the zero current level. According to their inactivation rates (τ), two main types of ASIC current can be distinguished (type 1 and type 2). ***B***, Analysis of the inactivation rate of native pH 6.6-induced ASIC currents in control condition and in the presence of the PcTx1 toxin. The slow-inactivating type 1 current is blocked by the toxin. ***C***, Functional distribution of type 1 and type 2 ASIC currents as a function of the neuron membrane capacitance. ***D***, Current-clamp experiment performed on a neuron exhibiting a type 2 ASIC current. A slight acidification of the external medium to pH 7.0 depolarizes the membrane sufficiently to trigger firing. Action potentials are magnified in the inset. ***E***, Effect of APETx2 on recombinant sustained ASIC3 current recorded at −80 mV from F11-transfected cells. Current was activated by external pH changes from pH 7.4 to 7.0, as indicated by the black bar. The APETx2 toxin was applied externally at 1 μM, as indicated. ***F***, Effect of APETx2 (5 μM) on native pH 6.6-evoked ASIC current recorded at −80 mV from retrogradely labeled sensory neurons innervating hindpaw muscles. The fast component of the current (type 2) is largely inhibited by the toxin. ***G***, Current-clamp experiment performed on the same neuron as in ***F***. The depolarization induced by the pH 6.6-evoked ASIC current was sufficient to trigger an action potential (magnified in the inset). The presence of APETx2 inhibits the pH 6.6-evoked depolarization and the action potential threshold is not reached.

neurons innervating the hindpaw muscles presented transient current with ASIC-like kinetics when exposed to pH 6.6 (data from 2 different cultures, $n = 9$ of 10 and 7 of 11 neurons, respectively). The ASIC-expressing neurons had an average membrane capacitance of 32.3 ± 5.2 pF and an average resting potential of −53.4 ± 2.9 mV. Two different types of ASIC currents were observed and were readily distinguished based on their inactivation kinetics (Fig. 1*A*). Type 1 current exhibited a slow inactivating rate ($\tau = 1841 \pm 104$ ms, present in 3 of 16 ASIC-expressing neurons) (Fig. 1*B*) similar to the inactivation rate observed for the current elicited by recombinant ASIC1a ($\tau = 1712 \pm 93$ ms, $n = 10$, data not shown) (Baron et al., 2008). This current was largely inhibited by the toxin PcTx1 (78 ± 20% of inhibition of the current amplitude) (Fig. 1*B*), a specific blocker of ASIC1a homomeric channels (Escoubas et al., 2000). These data indicate that, in DRG neurons innervating hindpaw muscles, the slow-inactivating type 1 current was mainly carried by homomeric ASIC1a channels. Conversely, type 2 current had rapid inactivation kinetics ($\tau = 217 \pm 26$ ms, present in 12 of 16 ASIC-expressing neurons) (Fig. 1*B*) close to the inactivation rates recorded for recombinant ASIC3 channels ($\tau = 234 \pm 11$ ms, $n = 14$, data not shown) (Waldmann et al., 1997b). PcTx1 had a small effect (32 ± 5% inhibition) on 70% of type 2 current-expressing neurons (7 of 10 neurons tested), showing the presence of low levels of homomeric ASIC1a channels together with ASIC3-type current in these neurons. The type 2 current was inhibited by the toxin APETx2, which blocks both the peak and the window current of ASIC3-containing channels (Diochot et al., 2004) (Fig. 1*E*). Indeed, application of APETx2 (5 μM) on a neuron displaying a mixture of ASIC currents resulted in a 50% inhibition of the peak amplitude evoked at pH 6.6 (Fig. 1*F*). Importantly, APETx2 also decreased neuronal excitability in response to pH 6.6 (Fig. 1*G*).

Finally, in 1 of 16 neurons expressing ASIC-type currents, the current kinetic displayed an intermediate inactivation rate ($\tau = 752$ ms) (Fig. 1*B*). This current was partly inhibited by the PcTx1 toxin (46% of inhibition), and the remaining current had an intermediate inactivation rate ($\tau = 550$ ms), which probably reflects the activity of a complex mix of homomeric ASIC1a and other heteromeric ASIC channels.

A detailed analysis of the whole-cell membrane capacitance of ASIC-type current-expressing neurons (Fig. 1*C*) showed that the type 1 current, mainly supported by homomeric ASIC1a channels, was expressed in small DRG neurons, with a cell capacitance of ~20 pF, while the type 2 currents, mainly supported by ASIC3 channels, were distributed in both small and large DRG neurons with cell capacitance ranging from 10 to 85 pF. Endogenous type 2 current (i.e., ASIC3-type) conferred to sensory neurons the capacity to electrically respond to very small acidifications near the physiological pH since activation of this current by a shift from resting pH 7.4 to pH 7.0 was sufficient to depolarize the membrane and promote action potential firing (Fig. 1*D*). Together, these data indicate that in neurons innervating hindpaw muscles, ASIC3-containing channels, alone or together with homomeric ASIC1a channels, support most of the ASIC current elicited by moderate external acidosis in a range that is relevant to incisional pain ($6.6 < \text{pH} < 7.4$).

ASIC3 is largely expressed in sensory neurons innervating the hindpaw plantar muscle

Functional data show a high level of ASIC3-type currents in rat DRG neurons innervating the hindpaw skeletal muscles, and we have analyzed the expression of the corresponding protein by immunohistochemistry. This analysis was done on sensory neurons innervating the plantar hindpaw muscle [i.e., the muscle incised in the model of postoperative pain of Brennan et al., (1996) used in the present study]. We identified this population of sensory neurons in L5 DRG by retrograde labeling through injection of the fluorescent dye fast blue in the plantar muscle followed by immunohistochemical staining for ASIC3. In naive rats, a large number of sensory neurons that innervate the plantar muscle expressed ASIC3 (75 ± 2%; $n = 4$ rats; 217 fast blue-labeled neurons analyzed) (Fig. 2*A*,*B*). Moreover, ~62% of the ASIC3-labeled neurons have diameters in the range of those recorded with patch-clamp (i.e., from 10 to 45 μm), which is consistent with the percentage of sensory neurons that innervate the hindpaw muscles and exhibit ASIC3-type currents (~57%, 12 of 21) (Fig. 1). Analysis of the soma size of the total population of ASIC3-expressing neurons showed a large expression in small-diameter neurons and a significant expression in medium- to large-diameter neurons (Fig. 2*C*) (674 ASIC3-positive neurons analyzed), which is in good agreement with previous results (Voilley et al., 2001; Molliver et al., 2005). The distribution of ASIC3 in neurons innervating the hindpaw plantar muscle (i.e., ASIC3 and fast blue-positive neurons) was slightly different from that of ASIC3 in the whole population of neurons, in which it was detected in a greater proportion of medium- to large-diameter neurons (Fig. 2*C*) (118 fast blue- and ASIC3-positive neurons analyzed). This distribution pattern is consistent with the large range of cell membrane capacitance observed on ASIC3-type neurons with the patch-clamp technique (Fig. 1*C*).

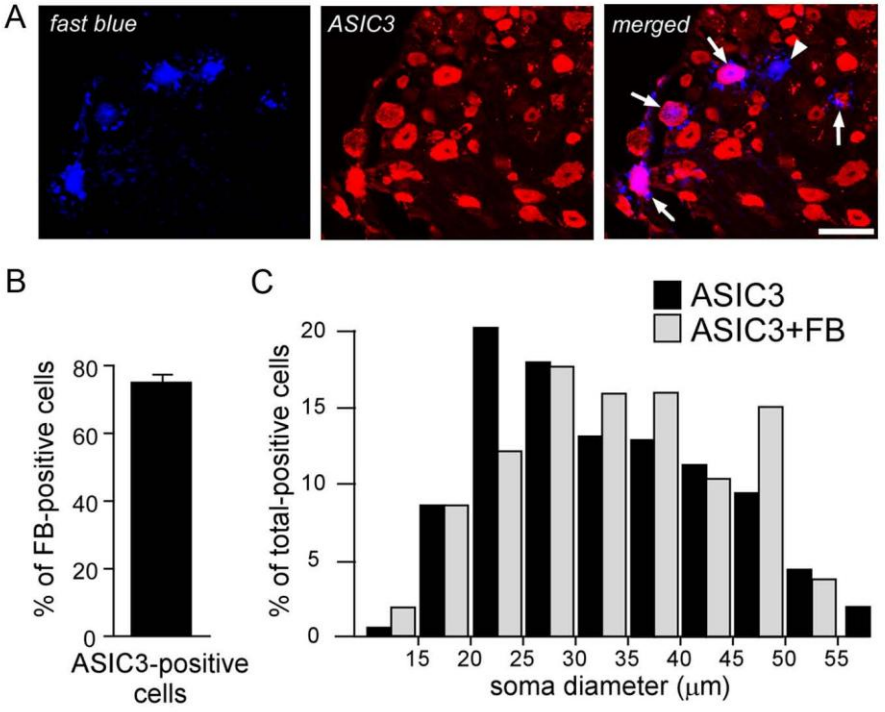


Figure 2. Analysis of ASIC3 expression in sensory neurons innervating the hindpaw plantar muscle. ***A***, Immunolocalization of ASIC3 in lumbar DRG neurons. Fast blue-positive neurons retrogradely labeled from the plantar muscle (left, blue) and ASIC3-positive neurons (middle, red) in L5 DRG of naive rats. Merged image (right) shows fast blue-positive neurons expressing (arrows) or not expressing (arrowhead) ASIC3 (scale bar, 100 μm). ***B***, Percentage of fast blue (FB)-positive neurons expressing the ASIC3 subunit (data from 4 rats, 217 FB-labeled neurons analyzed). ***C***, Distribution of ASIC3-positive neurons in L5 DRG neurons as a function of soma diameter. Histograms represent the percentage of the total population of ASIC3-positive neurons or of the ASIC3 + FB-positive cells associated with different soma diameter ranges. The proportion of medium to large neurons expressing ASIC3 is larger in neurons that innervate the hindpaw muscle compared with the whole population of ASIC3-positive cells.

ASIC3 contributes to the detection of postincisional pain

Because ASIC3 is largely expressed in sensory neurons innervating the hindpaw muscles (including the plantar muscle), where it constitutes the main ASIC-type current (Figs. 1, 2), we have analyzed its contribution to postoperative muscular pain in the plantar postincisional pain model in rat (Brennan et al., 1996). Postincisional pain behaviors were first analyzed 4 h after surgery (Fig. 3*A*) by measuring spontaneous flinching (Fig. 3*B*), heat hyperalgesia (Hargreaves test) (Fig. 3*C*), and hindpaw weight bearing (dynamic weight-bearing test) (Fig. 3*D*). Plantar muscle incision caused significant hyperalgesia in all three behavioral tests. We then tested the effect of pharmacological inhibition of ASIC3 by the specific inhibitory peptide APETx2 (Diochot et al., 2004). APETx2 was known to block the peak of the acid-induced current flowing through homomeric and heteromeric ASIC3 channels (Diochot et al., 2004). We show here that APETx2 also inhibits the ASIC3 sustained window current evoked by moderate external acidification to pH 7.0 (Fig. 1*E*), an acidification well in the range of the tissue pH reached after surgical incision in the rat (Woo et al., 2004). This sustained current has been proposed to be important for pain perception (Yagi et al., 2006; Deval et al., 2008; Salinas et al., 2009). Local intraoperative application of APETx2 (20 μl, 20 μM) significantly reduced the spontaneous pain behavior of operated rats compared with vehicle-treated animals (Fig. 3*B*) (reduction of the numbers of flinches by 52%, $p < 0.001$, $n = 19$ and 28, respectively). Conversely, animals treated with PcTx1 (a potent and specific inhibitory spider toxin for homomeric ASIC1a channels; 20 μl, 120 nM) did not show any significant reduction in the number of flinches (Fig. 3*B*, left) ($n = 10$). The role of ASIC3 was further confirmed by *in vivo* knockdown of ASIC3 expression through intrathecal injections of a specific siRNA targeting the ASIC3 mRNA (Fig. 3*A*). Uptake of this siRNA by lumbar DRG neurons innervating rat hindpaw and specific knockdown of ASIC3 mRNA versus other ASIC subunits and TRPV1 have been previously described (Deval et al., 2008). Rats treated with the ASIC3 siRNA displayed a significant decrease of the postoperative spontaneous pain behavior compared with animals injected with the control scramble siRNA (63% reduction of the number of flinches, $p < 0.05$, $n = 10$) (Fig. 3*B*, right). The flinching score of rats treated with the scramble siRNA (Fig. 3*B*, right) was not significantly different from the score of vehicle-treated animals (Fig. 3*B*, left) ($p = 0.39$, unpaired t test).

Hindpaw skin and muscle incisions have been shown to evoke primary heat hyperalgesia (Brennan et al., 1996) (i.e., hyperalgesia inside the area injured by the incision). Consistent with this

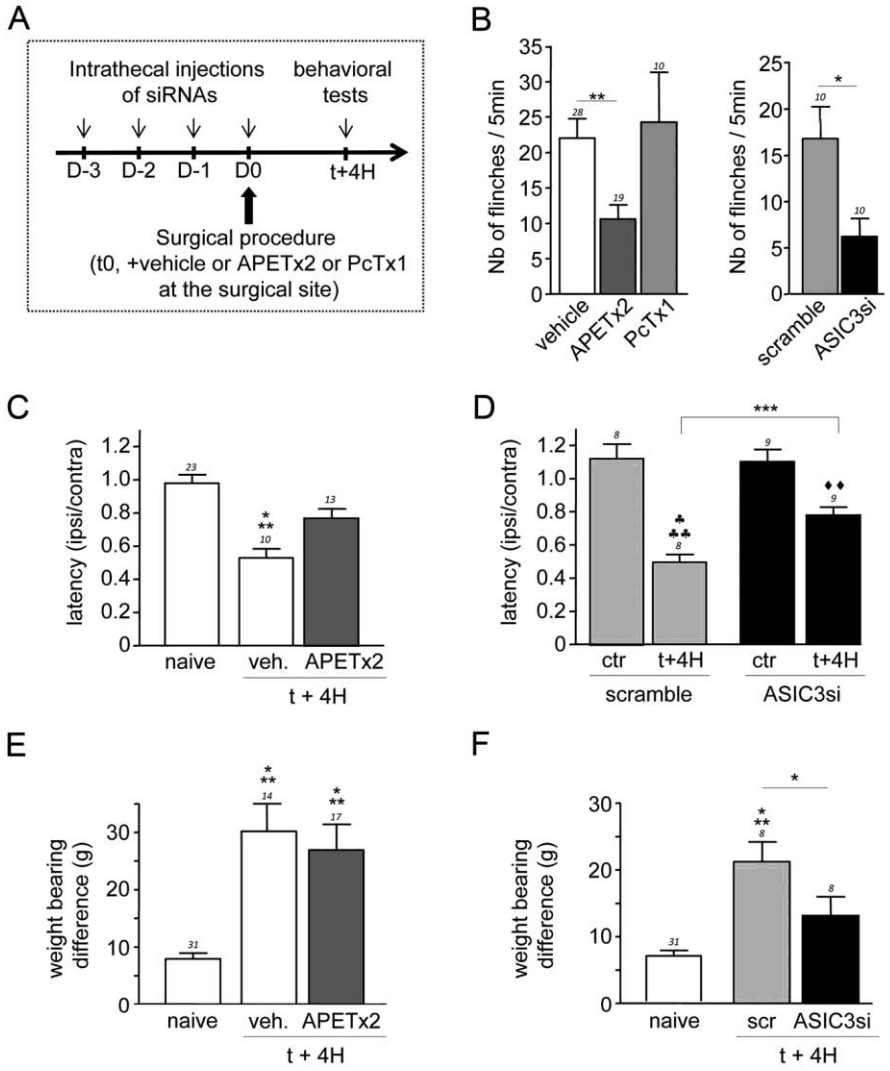


Figure 3. Effect of ASIC3 inhibition on postoperative pain 4 h after surgery. ***A***, Protocol used to test the effect of the ASIC inhibitory toxins (local application during surgery) and of the siRNAs (repetitive intrathecal injections before surgery) on acute postoperative pain (4 h after surgery). ***B***, Effect of APETx2 20 μM and PcTx1 120 nM (left), and siRNAs (scramble and ASIC3si; right) on spontaneous pain measured as the number of flinches of the ipsilateral hindpaw over a period of 5 min (**$p < 0.01$, Kruskal–Wallis test followed by a Dunn's *post hoc* test; *$p < 0.05$, Mann–Whitney test). ***C***, ***D***, Effect of local application of 20 μM APETx2 (***C***) and ASIC3 knockdown (***D***) on postoperative thermal hyperalgesia evaluated with the Hargreaves test. (***C***: ***$p < 0.001$, compared with naive animals, one-way ANOVA followed by a Tukey's *post hoc* test; ***D***: ♣♣♣$p < 0.001$, ♦♦$p < 0.01$, compared with scramble and ASIC3si controls (ctr), respectively, paired *t* tests, and ***$p < 0.001$, unpaired *t* test). ***E***, ***F***, Effect of local application of 20 μM APETx2 (***E***) and knockdown of ASIC3 (***F***) on postural pain evaluated with the dynamic weight-bearing test (*$p < 0.05$ and ***$p < 0.001$, one-way ANOVA followed by a Tukey's *post hoc* test). veh., Vehicle.

previous observation, animals treated with the vehicle displayed primary heat hyperalgesia measured by the Hargreaves test (ratio of ipsilateral to contralateral withdrawal latency significantly reduced in comparison with control animals, $p < 0.001$) (Fig. 3*C*). Intraoperative infusion of APETx2 induced a modest analgesia since the latency became not significantly different from the one of control animals (Fig. 3*C*). We also performed a Hargreaves test on animals where ASIC3 expression was knocked down by repetitive intrathecal injections of siRNA (Fig. 3*D*). The animals that were knocked down still developed heat hyperalgesia after surgery (Fig. 3*D*) ($p < 0.01$), but the hyperalgesia was significantly attenuated compared with scramble siRNA-treated animals (Fig. 3*D*) ($p < 0.001$). These data suggest that ASIC3 significantly contributes to primary heat hyperalgesia induced by the surgical procedure, but that inhibition of the channel is not sufficient to fully prevent hyperalgesia.

Surgical procedures provoke postural pain (guarding pain). We have used a weight-bearing test to evaluate postural equilibrium on freely moving rats following surgery (Fig. 3*E*,*F*). A difference in weight distribution between the operated and nonoperated paws reflected the intensity of postoperative pain presented by rats. The hindpaw weight-bearing difference measured 4 h after surgery was abolished in animals treated with ASIC3 siRNA (Fig. 3*F*), but was not significantly decreased in animals pretreated with local application of APETx2 (Fig. 3*E*). This could be explained by a slow onset of the pharmacological inhibition of ASIC3 by intraoperative application of the toxin on the weight-bearing behavior because of delayed toxin availability in deep muscular tissue. Comparatively, the knockdown inhibition obtained with repetitive siRNA treatment was already maximal at the time of surgery. Anyway, the effect of the siRNA suggests a participation of ASIC3 in postoperative postural pain. Together, these data reveal that peripheral inactivation of ASIC3 produces a significant analgesia 4 h after surgery in a rat model of incisional pain, and therefore support the involvement of ASIC3-containing channels in postoperative pain.

ASIC3 expression is upregulated in the model of postincisional pain

Animals treated with either local application of vehicle or intrathecal injections of scramble siRNA still experienced pain 24 h after surgery, showing a hindpaw weight-bearing difference of ~40 g ($p < 0.001$ compared with naive animals) (Fig. 4*A*). Pain was largely attenuated by both local application of APETx2 during surgery and ASIC3 knockdown (Fig. 4*A*). We then analyzed modifications in the expression of ASIC3 mRNA and protein in sensory neurons innervating the injured plantar muscle after surgery. RT-qPCR experiments revealed that animals showed an increased level of ASIC3 transcripts in ipsilateral DRGs (L4–L6) compared with their contralateral counterparts 24 h after surgery (fold expression, ipsilateral vs contralateral DRGs: 1.50 ± 0.12; $n = 4$) (Fig. 4*B*), while naive nonoperated animals showed no difference (fold expression: 0.99 ± 0.12; $n = 5$) (Fig. 4*B*). Consistent with the increase in ASIC3 transcripts, the number of ASIC3-positive neurons that innervate the incised muscle (i.e., fast blue retrogradely labeled neurons from plantar muscles) was also significantly increased 24 h after surgery in the ipsilateral L5 DRG (controlateral vs ipsilateral, 74 ± 2% and 87 ± 1% of fast blue-labeled neurons, respectively; $n = 4$ rats; $p < 0.05$; at least 268 fast blue-labeled neurons analyzed in each group) (Fig. 4*C*). The distribution of ASIC3-expressing neurons innervating the hindpaw plantar muscle was modified in the ipsilateral DRGs 24 h after surgery with a large increase in the proportion of small-sized neurons

(Fig. 4*D*) (118 and 164 neurons analyzed for contralateral and ipsilateral DRGs, respectively). The distribution pattern in contralateral DRGs from operated animals was similar to the pattern in DRGs from naive rats (Fig. 2*C*). This suggests, together with the similar fraction of fast blue-positive neurons that expressed ASIC3 in naive animals and in contralateral DRG of operated rats (75 ± 2% and 74 ± 2%, respectively; $n = 4$ rats; at least 217 fast blue-labeled neurons analyzed in each group) (Figs. 2*B*, 4C), that the surgery had a unilateral effect on ASIC3 expression, with a selective increase in the DRGs innervating the operated paw. Our observations demonstrate that postoperative pain induced by plantar incision 24 h after surgery involves peripheral ASIC3 since (1) its expression is significantly increased in sensory neurons innervating the incised muscle, especially in small-diameter neurons, and since (2) the postoperative pain is abolished when ASIC3 is inactivated.

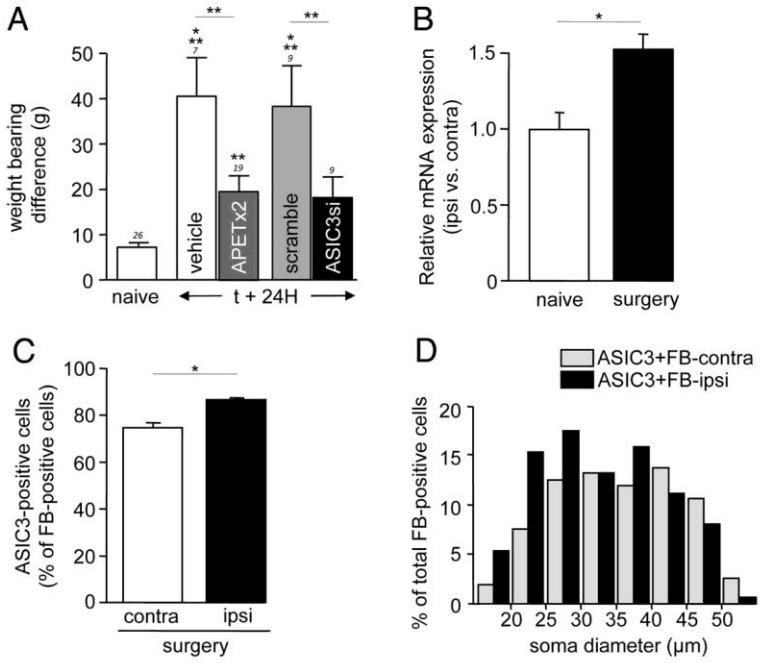


Figure 4. Postoperative pain and ASIC3 expression 24 h after surgery. ***A***, Dynamic weight-bearing test performed in rats treated with scramble or ASIC3 (ASIC3si) siRNAs (intrathecal injections, see experimental protocol in Fig. 3*A*), vehicle or local application of APETx2 (**$p < 0.01$, ***$p < 0.001$, one-way ANOVA followed by a Tukey's *post hoc* test). ***B***, RT-qPCR analysis of the level of ASIC3 mRNA in lumbar DRGs (L4–L6) from naive and operated rats. Data are represented as the ratio of ipsilateral over contralateral DRG (*$p < 0.05$, unpaired *t* test, $n = 4$ rats). ***C***, Percentage of fast blue (FB)-positive neurons expressing the ASIC3 protein in contralateral and ipsilateral DRG 24 h after surgery (*$p < 0.05$, paired *t* test, $n = 4$ rats, 268 and 290 FB-labeled neurons analyzed, respectively). ***D***, Distribution of ASIC3-positive neurons innervating the plantar muscle (i.e., FB-positive) as a function of soma diameter in contralateral and ipsilateral L5 DRG 24 h after surgery ($n = 4$ rats, 268 and 290 FB-labeled neurons analyzed, respectively). Data represent the number of ASIC3-positive neurons expressed as the percentage of total fast blue-positive neurons (i.e., the sum of the bars is 74% for ASIC3 + FB-contra and 87% for ASIC3 + FB-ipsi). contra, Contralateral; ipsi, ipsilateral.

Discussion

Postincisional pain models have been very useful to investigate the pathophysiology of postoperative pain (Brennan et al., 1996; Pogatzki et al., 2002; Duarte et al., 2005). One of the best characterized models is the one developed by Brennan et al. (1996), where hindpaw incision induces evoked and nonevoked pain in agreement with clinical evidence (Pogatzki-Zahn et al., 2007). Peripheral and central sensitizations seem to be involved in the development and maintenance of surgical pain (Pogatzki-Zahn et al., 2007). Of particular interest is the local pH decrease at the site of incision (between pH 6.91 and 6.54, depending on the incision model) (Woo et al., 2004), suggesting that H^+-gated depolarizing channels in primary afferent neurons such as ASICs and TRPV1 could contribute to postoperative pain.

TRPV1 has been reported to mediate spontaneous activity and heat sensitization of cutaneous primary afferents after plantar incision (Banik and Brennan, 2009), and TRPV1-containing nociceptors have been implicated either in mechanical allodynia and hyperalgesia (Pospisilova and Palecek, 2006) or in heat hyperalgesia and guarding pain (Hamalainen et al., 2009; Kang et al., 2010). The chemosensitivity of C-fibers innervating the rat hindpaw skin also supports a possible implication of ASICs in chemical sensitization (Kang and Brennan, 2009; Kang et al., 2010). This was further suggested by the effect, in the incision model, of amiloride (a poorly selective) and A-317567 (a nondiscriminant) blockers of ASICs (Dubé et al., 2005). We show here that ASIC3 is highly expressed in skeletal muscle afferents of the rat hindpaw, where it is activated by moderate acidifications, and that selective pharmacological block of its activity or *in vivo* knockdown of its expression produces a significant analgesia after surgery.

ASIC3-containing channels are particularly well suited to detect local changes in pH associated with postoperative pain and to contribute to nociceptor sensitization: (1) they exhibit the highest sensitivity to extracellular protons among ASIC channels (Yagi et al., 2006; Deval et al., 2008; Salinas et al., 2009); (2) they are activated in the range of pH recorded after skin and/or muscle incision (Woo et al., 2004); and (3) they display a sustained depolarizing current in response to very moderate acidosis that is compatible with the detection of nonadaptating pain. This sustained window current, which is activated for pH values between 6.5 and 7.4 and is due to the overlap between the pH-dependent activation and inactivation of the channel (Yagi et al., 2006; Deval et al., 2010), has been proposed to contribute to pain during myocardial ischemia and cutaneous inflammation (Yagi et al., 2006; Deval et al., 2008). This window current is blocked by APETx2, as shown in the present study. We have recently shown that peripheral ASIC3 channels in rat skin nociceptors are sensors of acidic pain and are able to integrate several molecular signals produced during inflammation to contribute to primary hyperalgesia (Deval et al., 2008). Although surgical hypersensitivity seems to involve an inflammatory component, the pathophysiological mechanism associated with incision is clearly different from the one causing pain during inflammation (Pogatzki-Zahn et al., 2007). Indeed, inhibition of ASIC3 fully eliminates primary heat hyperalgesia caused by inflammation (Deval et al., 2008), but we report here that it does not completely reverse primary heat hyperalgesia caused by incision. It has also been shown that deep tissue (i.e., muscle) rather than skin incision is critical for the development of guarding pain, which is similar to pain at rest in postoperative patients, and for spontaneous activity in both primary sensory neurons (Xu and Brennan, 2010) and dorsal horn neurons (Xu and Brennan, 2009). Interestingly, ASIC3 has

been involved in muscular pain caused by repeated acid injections and inflammation in mouse (Sluka et al., 2003, 2007). The more robust effect seen here after knockdown of ASIC3 on weight bearing compared with primary thermal hyperalgesia may thus reflect an important role of ASIC3 in deep tissue, including muscle (Sutherland et al., 2001; Sluka et al., 2003; Ikeuchi et al., 2008), after surgery. However, postural pain that appears 24 h postsurgery in animals subjected to skin incision alone is also blocked by APETx2 (supplemental Fig. 1, available at www.jneurosci.org as supplemental material), also suggesting a contribution of ASIC3 to prolonged skin pain. ASIC3 thus appears to play an important role in the primary afferent fibers innervating skin and deep tissues such as muscle, sensing pain caused by acidosis and increasing the nociceptive input to the spinal cord, which results in central sensitization. In good agreement with this, experiments performed in rats have reported that activation of nociceptors by acid stimuli induces central sensitization at the level of the dorsal spinal cord (Carpenter et al., 2001), and that deep tissue incision (i.e., plantar muscle) increases both the proportion of dorsal horn neurons with spontaneous activity and the rate of this spontaneous activity (Xu and Brennan, 2009).

Tissue-induced release of mediators, ischemia, and local acidosis are important for primary hypersensitivity and sensitization of nociceptors in the incisional pain models (Woo et al., 2004). A greater response to pH 6.0 and lactic acid of the afferent fibers innervating the rat hindpaw skin has been described after incision (Kang and Brennan, 2009). Lactate enhances the activity of ASIC3 (Immke and McCleskey, 2001), and the increase in tissue lactate concentration (and possibly other mediators) that parallels the decrease in tissue pH after incision may potentiate the acid-induced activity of ASIC3 (Woo et al., 2004; Kim et al., 2007). This effect can be reinforced by the increased expression of ASIC3 in nociceptors 24 h after incision that was observed in the present work. Interestingly, nerve growth factor, which is an important regulator of ASIC3 gene expression (Mamet et al., 2002, 2003), has been involved in nociceptor sensitization and heat hyperalgesia after incision (Zahn et al., 2004).

In conclusion, this study involves peripheral ASIC3 channels in postincisional pain. ASIC3 sustained current activated in the pH range reached after tissue incision is likely to be an important contributor to sensory neuron depolarization and hyperexcitability. Interestingly, a single intraoperative application of an ASIC3 inhibitor evokes a potent analgesic effect 24 h after surgery. ASIC3 may thus represent a new pharmacological target for the management of postoperative pain in addition to wound infiltration with local anesthetics (Liu et al., 2006; Scott, 2010) and other currently available approaches.

References

Banik RK, Brennan TJ (2009) Trpv1 mediates spontaneous firing and heat sensitization of cutaneous primary afferents after plantar incision. Pain 141:41–51.

Baron A, Voilley N, Lazdunski M, Lingueglia E (2008) Acid sensing ion channels in dorsal spinal cord neurons. J Neurosci 28:1498–1508.

Bässler EL, Ngo-Anh TJ, Geisler HS, Ruppersberg JP, Gründer S (2001) Molecular and functional characterization of acid-sensing ion channel (ASIC) 1b. J Biol Chem 276:33782–33787.

Bove SE, Flatters SJ, Inglis JJ, Mantyh PW (2009) New advances in musculoskeletal pain. Brain Res Rev 60:187–201.

Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF (1996) Characterization of a rat model of incisional pain. Pain 64:493–501.

Carpenter KJ, Nandi M, Dickenson AH (2001) Peripheral administration of low pH solutions causes activation and sensitisation of convergent dorsal horn neurones in the anaesthetised rat. Neurosci Lett 298:179–182.

Chen CC, England S, Akopian AN, Wood JN (1998) A sensory neuron-specific, proton-gated ion channel. Proc Natl Acad Sci U S A 95:10240–10245.

Deval E, Noël 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, Noël 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.

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.

Duarte AM, Pospisilova E, Reilly E, Mujenda F, Hamaya Y, Strichartz GR (2005) Reduction of postincisional allodynia by subcutaneous bupivacaine: findings with a new model in the hairy skin of the rat. Anesthesiology 103:113–125.

Dubé GR, Lehto SG, Breese NM, Baker SJ, Wang X, Matulenko MA, Honoré 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.

Escoubas P, De Weille JR, Lecoq A, Diochot S, Waldmann R, Champigny G, Moinier D, Ménez A, Lazdunski M (2000) Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na+ channels. J Biol Chem 275:25116–25121.

Flatters SJ (2008) Characterization of a model of persistent postoperative pain evoked by skin/muscle incision and retraction (SMIR). Pain 135:119–130.

Hamalainen MM, Subieta A, Arpey C, Brennan TJ (2009) Differential effect of capsaicin treatment on pain-related behaviors after plantar incision. J Pain 10:637–645.

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.

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 10:336–342.

Immke DC, McCleskey EW (2001) Lactate enhances the acid-sensing Na+ channel on ischemia-sensing neurons. Nat Neurosci 4:869–870.

Kang S, Brennan TJ (2009) Chemosensitivity and mechanosensitivity of nociceptors from incised rat hindpaw skin. Anesthesiology 111:155–164.

Kang S, Wu C, Banik RK, Brennan TJ (2010) Effect of capsaicin treatment on nociceptors in rat glabrous skin one day after plantar incision. Pain 148:128–140.

Kim TJ, Freml L, Park SS, Brennan TJ (2007) Lactate concentrations in incisions indicate ischemic-like conditions may contribute to postoperative pain. J Pain 8:59–66.

Liu SS, Richman JM, Thirlby RC, Wu CL (2006) Efficacy of continuous wound catheters delivering local anesthetic for postoperative analgesia: a quantitative and qualitative systematic review of randomized controlled trials. J Am Coll Surg 203:914–932.

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 22:10662–10670.

Mamet J, Lazdunski M, Voilley N (2003) How nerve growth factor drives physiological and inflammatory expressions of acid-sensing ion channel 3 in sensory neurons. J Biol Chem 278:48907–48913.

Moiniche S, Dahl JB, Erichsen CJ, Jensen LM, Kehlet H (1997) Time course of subjective pain ratings, and wound and leg tenderness after hysterectomy. Acta Anaesthesiol Scand 41:785–789.

Molliver DC, Immke DC, Fierro L, Paré M, Rice FL, McCleskey EW (2005) ASIC3, an acid-sensing ion channel, is expressed in metaboreceptive sensory neurons. Mol Pain 1:35.

Pavlin DJ, Chen C, Penaloza DA, Polissar NL, Buckley FP (2002) Pain as a factor complicating recovery and discharge after ambulatory surgery. Anesth Analg 95:627–634.

Perkins FM, Kehlet H (2000) Chronic pain as an outcome of surgery. A review of predictive factors. Anesthesiology 93:1123–1133.

Pogatzki EM, Niemeier JS, Brennan TJ (2002) Persistent secondary hyperalgesia after gastrocnemius incision in the rat. Eur J Pain 6:295–305.

Pogatzki-Zahn EM, Zahn PK, Brennan TJ (2007) Postoperative pain–clinical implications of basic research. Best Pract Res Clin Anaesthesiol 21:3–13.

Pospisilova E, Palecek J (2006) Post-operative pain behavior in rats is reduced after single high-concentration capsaicin application. Pain 125:233–243.

Salinas M, Lazdunski M, Lingueglia E (2009) Structural elements for the generation of sustained currents by the acid pain sensor ASIC3. J Biol Chem 284:31851–31859.

Scott NB (2010) Wound infiltration for surgery. Anaesthesia 65 [Suppl 1]:67–75.

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 106:229–239.

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 129:102–112.

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 98:711–716.

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 21:8026–8033.

Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Heurteaux C, Lazdunski M (1997a) A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. Nature 386:173–177.

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 272:20975–20978.

Woo YC, Park SS, Subieta AR, Brennan TJ (2004) Changes in tissue pH and temperature after incision indicate acidosis may contribute to postoperative pain. Anesthesiology 101:468–475.

Wu CL, Naqibuddin M, Rowlingson AJ, Lietman SA, Jermyn RM, Fleisher LA (2003) The effect of pain on health-related quality of life in the immediate postoperative period. Anesth Analg 97:1078–1085.

Xu J, Brennan TJ (2009) Comparison of skin incision vs. skin plus deep tissue incision on ongoing pain and spontaneous activity in dorsal horn neurons. Pain 144:329–339.

Xu J, Brennan TJ (2010) Guarding pain and spontaneous activity of nociceptors after skin versus skin plus deep tissue incision. Anesthesiology 112:153–164.

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 99:501–509.

Zahn PK, Subieta A, Park SS, Brennan TJ (2004) Effect of blockade of nerve growth factor and tumor necrosis factor on pain behaviors after plantar incision. J Pain 5:157–163.

3. RESUME DE L'ETUDE ET DISCUSSION

Les douleurs chroniques consécutives à des interventions chirurgicales sont décrites en clinique par des douleurs évoquées et non évoquées, c'est-à-dire faisant suite à une stimulation particulière (chaud, froid, pression…) ou se déclenchant de manière spontanée, sans aucune stimulation. Face au développement et au maintien de cette douleur chirurgicale, il semblerait qu'une sensibilisation périphérique et centrale se produise. Cela, en plus de l'acidité qui existe autour du tissu lésé, laisse penser à un rôle des canaux TRPV1 et ASIC dans ces mécanismes.

Les nombreuses études utilisant le modèle d'incision plantaire de Brennan, ont impliqué les canaux TRPV1 dans la douleur spontanée, la sensibilisation au chaud (Banik & Brennan, 2009), l'allodynie et l'hyperalgie mécanique (Pospisilova & Palecek, 2006). Plus récemment, ces canaux ont été impliqués dans la douleur de posture (Hamalainen et al, 2009), (Kang et al, 2010), comparable à la douleur au repos décrite par les patients qui ont subi une intervention chirurgicale.

Une étude, utilisant également le modèle de Brennan, a suggéré une implication des ASIC dans la douleur post-incisionnelle (Dube et al, 2005). Le blocage de l'activité de ces canaux par des inhibiteurs non discriminants (amiloride et A317567) a produit un effet analgésique (Dube et al, 2005).

Dans notre étude sur la douleur post-opératoire, nous avons montré l'existence de courants de type ASIC, et principalement ASIC1 et ASIC3, lors d'acidose modérée dans les neurones innervant les muscles des rats. En effet, ASIC3 est un acteur principal de la douleur générée par l'incision. Qu'elle soit spontanée, en réponse à une stimulation chaude, ou posturale, cette douleur est réduite par le blocage des canaux ASIC3, lors de l'application d'APETx2 ou lors d'un traitement avec des siARN (ou ARN interférentiels) spécifiques de ces canaux. De plus, nous avons montré qu'ASIC3 est surexprimé après la chirurgie dans les neurones innervant les muscles, notamment dans les plus petits neurones. Cette surexpression post-chirurgicale se produit uniquement du côté opéré. Toutefois, le blocage de l'activité des canaux ASIC3 ne suffit pas à abolir totalement les douleurs consécutives à l'incision, laissant penser à un rôle non exhaustif des canaux ASIC3 et une participation d'autres canaux, comme les TRPV1. Il a également été montré que l'incision des tissus profonds comme le muscle n'a pas les mêmes conséquences qu'une incision cutanée, plus superficielle. En effet, l'incision musculaire plutôt que celle de la peau, a un rôle central dans le développement de la douleur posturale et dans l'activité spontanée des nocicepteurs (Xu & Brennan, 2010) et des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (Xu & Brennan, 2009). De manière intéressante, ASIC3 a été impliqué dans la douleur musculaire causée par l'inflammation ou des injections répétées d'acide chez la souris (Sluka et al, 2003), (Sluka et al, 2007). Cela reflète une fonction importante d'ASIC3 après une chirurgie dans les tissus profonds incluant le muscle (Sutherland et al, 2001), (Sluka et al, 2003), (Ikeuchi et al, 2008). ASIC3 pourrait jouer un rôle primordial au niveau des fibres afférentes primaires qui

innervent la peau et le muscle, dans la détection de l'acidose causée par l'incision, conduisant à une augmentation du signal nociceptif dans la moelle épinière et à une sensibilisation centrale. En accord avec ceci, des expérimentations effectuées sur les rats ont montré que l'activation des nocicepteurs par des stimuli acides induit une sensibilisation centrale au niveau de la moelle épinière dorsale (Carpenter et al, 2001). De plus, l'incision musculaire augmente la proportion de neurones de la corne dorsale ayant une activité spontanée et augmente le niveau de cette activité spontanée (Xu & Brennan, 2009).

La libération de médiateurs par les tissus, l'ischémie et l'acidification locale sont trois aspects importants pour l'hypersensibilité primaire et la sensibilisation des nocicepteurs dans les modèles animaux d'incision douloureuse (Woo et al, 2004). D'autant plus qu'après incision, une réponse plus forte des fibres afférentes innervant la peau de la patte de rat a été décrite à pH 6,0 et en présence d'acide lactique (Kang & Brennan, 2009). Le lactate augmente l'activité des canaux ASIC3 (Immke & McCleskey, 2001b). Or, la concentration de lactate augmente parallèlement à l'acidification tissulaire après une incision, ce qui peut potentialiser l'activité d'ASIC3 induite par les protons (Woo et al, 2004), (Kim et al, 2007). Ces effets peuvent être renforcés par l'augmentation d'expression d'ASIC3 que nous avons constatée dans les nocicepteurs 24 h après l'opération. De plus, de manière intéressante, le NGF, qui est un régulateur important de l'expression génique d'ASIC3 (Mamet et al, 2002; Mamet et al, 2003), a été impliqué dans la sensibilisation des nocicepteurs et dans l'hyperalgie au chaud après une incision (Zahn et al, 2004).

Pour conclure, dans cette étude nous avons montré l'implication des canaux ASIC3 périphériques dans la douleur post-opératoire. Le courant soutenu d'ASIC3, activé pour des acidoses modérées, qui se produisent lors d'une incision tissulaire, contribue probablement à la dépolarisation du neurone sensoriel et à l'hyperexcitabilité. De manière intéressante l'application unique durant l'opération d'un inhibiteur d'ASIC3, induit une analgésie 24 h après la chirurgie. Outre les infiltrations d'anesthésiques locaux utilisées au cours des interventions chirurgicales (Liu et al, 2006), (Scott, 2010) et les autres approches actuellement disponibles, ASIC3 pourrait devenir une nouvelle cible thérapeutique pour la prise en charge des douleurs post-opératoires.

B. ROLE ET REGULATION DU CANAL IONIQUE ASIC3 HUMAIN

1. CONTEXTE DE L'ETUDE

Parmi les canaux ASIC, les canaux ASIC3 ont un intérêt particulier. En effet, 1) ils sont spécifiques des neurones sensoriels chez les rongeurs (Waldmann et al, 1997a), 2) ils sont très sensibles aux protons, et activés lors de faibles diminutions du pH physiologique, ce qui permet de générer une dépolarisation et conduit à une excitabilité neuronale (Deval et al, 2003), 3) ils possèdent un courant soutenu qui perdure lors d'acidose modérée, que l'on pourrait associer aux douleurs qui se maintiennent au cours du temps , enfin, 4) ils sont régulés par de nombreux facteurs inflammatoires comme l'ATP (Birdsong et al, 2010), l'acide lactique (Immke & McCleskey, 2001a), l'acide arachidonique (Smith et al, 2007), (Deval et al, 2008) et l'hypertonicité (Deval et al, 2008). Toutes ces propriétés font d'ASIC3 un acteur important dans la douleur.

Les canaux ASIC3 périphériques ont été impliqués dans différents types de douleurs telles que la douleur acide (Deval et al, 2008), inflammatoire (Deval et al, 2008), et post-opératoire (Deval et al, 2011). Ils contribuent à l'hyperalgie mécanique primaire et secondaire dans les muscles et les articulations consécutive à une inflammation (Sluka et al, 2009), (Price et al, 2001), (Sluka et al, 2007). Ils sont également impliqués dans la nociception mécanique cutanée et viscérale (Price et al, 2001), (Jones et al, 2005), (Page et al, 2005) ainsi que dans la perception de l'acidité au niveau gastro-œsophagien (Wultsch et al, 2008).

Toutefois, la plupart des études ayant été réalisées sur les protéines ASIC3 de rongeurs, nous nous sommes intéressés au canal humain. Cette protéine, structurellement proche de celle des rongeurs, a en effet été très peu caractérisée. Les objectifs de cette étude sont les suivants :

- **Etudier la distribution du canal ASIC3 chez l'Homme**
- **Etudier les propriétés biophysiques du canal ASIC3 humain**

2. ARTICLE

“Human ASIC3 channel dynamically adapts its activity to sense the extracellular pH in both acidic and alkaline directions”
(Le canal ASIC3 humain adapte son activité de manière dynamique pour détecter le pH extracellulaire dans les deux directions, l’acidification et l’alcalinisation)

Anne Delaunay, Xavier Gasull, Miguel Salinas, Jacques Noël, Valérie Friend, Eric Lingueglia and Emmanuel Deval

Human ASIC3 channel dynamically adapts its activity to sense the extracellular pH in both acidic and alkaline directions

Anne Delaunay[a,b,c,1], Xavier Gasull[a,d,e,1], Miguel Salinas[a,b,c], Jacques Noël[a,b,c], Valérie Friend[a,b,c], Eric Lingueglia[a,b,c,2,3], and Emmanuel Deval[a,b,c,2,3]

[a]Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7275, 06560 Valbonne, France; [b]Université de Nice-Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, France; [c]LabEx Ion Channel Science and Therapeutics, 06560 Valbonne, France; [d]Neurophysiology Laboratory, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Casanova 143, 08036 Barcelona, Spain; and [e]Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Rosello 149-153, 08036 Barcelona, Spain

Edited by Michael J. Welsh, Howard Hughes Medical Institute, Iowa City, IA, and approved June 28, 2012 (received for review December 12, 2011)

In rodent sensory neurons, acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) has recently emerged as a particularly important sensor of nonadaptive pain associated with tissue acidosis. However, little is known about the human ASIC3 channel, which includes three splice variants differing in their C-terminal domain (hASIC3a, hASIC3b, and hASIC3c). hASIC3a transcripts represent the main mRNAs expressed in both peripheral and central neuronal tissues (dorsal root ganglia [DRG], spinal cord, and brain), where a small proportion of hASIC3c transcripts is also detected. We show that hASIC3 channels (hASIC3a, hASIC3b, or hASIC3c) are able to directly sense extracellular pH changes not only during acidification (up to pH 5.0), but also during alkalization (up to pH 8.0), an original and inducible property yet unknown. When the external pH decreases, hASIC3 display a transient acid mode with brief activation that is relevant to the classical ASIC currents, as previously described. On the other hand, an external pH increase activates a sustained alkaline mode leading to a constitutive activity at resting pH. Both modes are inhibited by the APETx2 toxin, an ASIC3-type channel inhibitor. The alkaline sensitivity of hASIC3 is an intrinsic property of the channel, which is supported by the extracellular loop and involves two arginines (R68 and R83) only present in the human clone. hASIC3 is thus able to sense the extracellular pH in both directions and therefore to dynamically adapt its activity between pH 5.0 and 8.0, a property likely to participate in the fine tuning of neuronal membrane potential and to neuron sensitization in various pH environments.

sodium channels | nociception

Acid-sensing ion channels (ASICs) are depolarizing cationic channels gated by extracellular protons (1–3). Four genes encoding at least six subunits (ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3, and ASIC4) have been identified so far in rodents. Functional channels have been proposed to result from the trimeric association of subunits (4), leading to homomeric or heteromeric channels. ASICs are largely expressed in neurons, both in central and peripheral nervous systems. Whereas ASIC1a and ASIC2 are widely present in the rodent nervous system, the expression of ASIC1b and ASIC3 is primarily restricted to sensory neurons (5–7). The ASIC3 subunit is highly expressed in rat nociceptive neurons (8, 9). The expression pattern of ASIC subunits is less well documented in humans, where ASIC3 (10–12) has three variants differing in their C-termini (2). The physiological relevance and properties of these human variants have so far never been studied.

Several physiological and/or physiopathological conditions, such as synaptic transmission, bone resorption, ischemia, inflammation, tumor development, or tissue incisions, are accompanied by extracellular acidifications. Moreover, tissue acidosis is well known to be painful (13) and inhibition of ASICs in healthy human volunteers (14, 15) has revealed the important role of these channels in sensing acid-induced pain provoked by cutaneous acidification. Among ASICs, ASIC3-containing channels are particularly interesting candidates for sensing the nonadaptive pain caused by protons. ASIC3 channels have the property to generate a sustained depolarizing current in response to moderate acidifications, and are able to integrate different inflammatory or ischemic stimuli such as protons, ATP, lactic and arachidonic acid, and hypertonicity (16–19). All these properties have been proposed to be important for the role of ASIC3 in pain (16, 20, 21). Peripheral ASIC3-containing channels have been shown (*i*) to participate to acidic, inflammatory, and postoperative pain (16, 22, 23); (*ii*) to contribute to primary and/or secondary mechanical hyperalgesia in muscles and joints after inflammation or injury (3, 24, 25); (*iii*) to be involved in cutaneous and visceral mechano-sensation and mechano-nociception (24, 26, 27, 28); and (*iv*) to support acid sensing in gastroesophageal afferents (29).

Most of the studies on ASIC3 were performed in rodents and used rodent cDNAs. The detailed biophysical properties and tissue distribution of human ASIC3 remain poorly characterized. We report here that human ASIC3 (hASIC3) not only sense extracellular acidification but also extracellular alkalization. This intrinsic capacity to behave as an acido-basic sensor brings, together with its wide distribution within the human nervous system, an additional dimension to the role of hASIC3 channel in pain and other neurophysiological processes in humans.

Results

Distribution of Human ASIC3 in Neuronal Tissues. In the rodent nervous system, ASIC3 is mostly expressed in sensory neurons (7), and functional studies have shown that native ASIC currents in central neurons are carried by ASIC1a and ASIC2 channels (30, 31). We performed quantitative RT-PCR experiments on different human neuronal tissues to assess the relative abundance of messenger RNAs for the three human isoforms hASIC3a, hASIC3b, and hASIC3c. We found that the hASIC3a mRNA is the main ASIC3 isoform expressed in human neuronal tissues, although hASIC3c is also significantly detected (Fig. 1, see also Fig. S1). The hASIC3b mRNA expression appears negligible in all tested tissues. We therefore focused on hASIC3a in this study.

Author contributions: X.G., M.S., E.L., and E.D. designed research; A.D., X.G., M.S., J.N., V.F., and E.D. performed research; A.D., X.G., M.S., J.N., V.F., E.L., and E.D. analyzed data; and X.G., J.N., E.L., and E.D. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

[1]A.D. and X.G. contributed equally to this work.

[2]E.L. and E.D. contributed equally to this work.

[3]To whom correspondence may be addressed. E-mail: deval@ipmc.cnrs.fr or lingueglia@ipmc.cnrs.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1120350109/-/DCSupplemental.

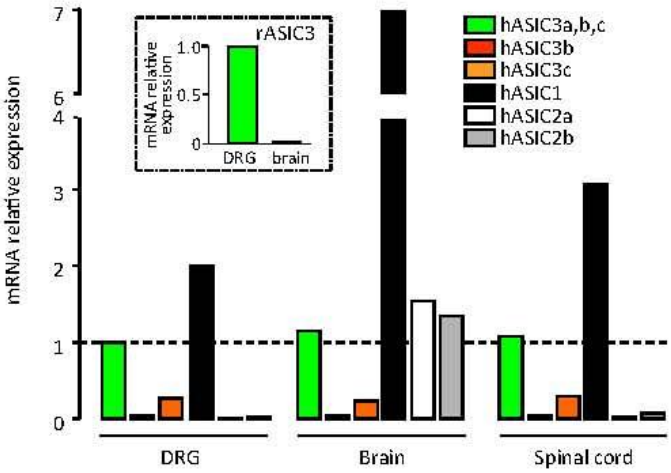


Fig. 1. Relative expression of ASIC mRNAs in human neuronal tissues. Quantitative RT-PCR experiments performed on total RNA from human DRG, brain, and spinal cord. (*Inset*) relative expression of ASIC3 in rat DRG and brain as a comparison. Expression is normalized to the expression of ASIC3 in DRG.

We found a high level of expression of hASIC3 mRNAs in spinal cord and brain, comparable to the expression level in dorsal root ganglia (DRG), which is different from rodent where the ASIC3 mRNA is mainly restricted to DRG (Fig. 1, *Inset*). ASIC1 mRNAs remain, however, the predominant ASIC transcripts in human brain (Fig. 1).

Nonconventional Gating of hASIC3a. When heterologously expressed in F-11 cells, rat ASIC3 channel presented a typical biphasic inward current following moderate acidification (pH 8.0 to 7.0), with a transient phase followed by a noninactivating window current (see Fig. S2*A*). In similar conditions, human ASIC3a showed two different types of currents (Fig. 2). We observed a "classic" ASIC3-type current in 46% of hASIC3-expressing cells (70 out of 153 cells, see *Materials and Methods*) (Fig. 2, *inset*), which was related to the typical current associated with ASIC3 (i.e., a transient phase followed by a sustained plateau), and a "nonconventional" current, in 54% of cells (83 out of 153 cells) (Fig. 2), with an inward transient phase followed by an outward-going plateau phase more positive than the current level at pH 8.0. Membrane capacitances of the cells showing classic and nonconventional currents were identical (30.2 ± 2.4 pF and 29.5 ± 1.6 pF, respectively; $P = 0.81$, unpaired t test). As previously described (11), the classic hASIC3a current (Fig. 2, *Inset*) displayed a smaller plateau than its rat equivalent (Fig. S2*A*), because of a shift of the pH-dependent inactivation of hASIC3a toward more alkaline values, which led to a smaller window current. The transient phase of the classic and the nonconventional hASIC3 currents displayed the same activation curve in response to extracellular acidification ($pH_{1/2}$ = 6.56 and 6.59 with Hill slopes of 3.0 and 2.8, respectively; see Fig. S2*B*), and were both sensitive to the ASIC3 inhibitory toxin (APETx2) (see Fig. S2*B*, *Inset*), which is known to inhibit ASIC3-type channels (32).

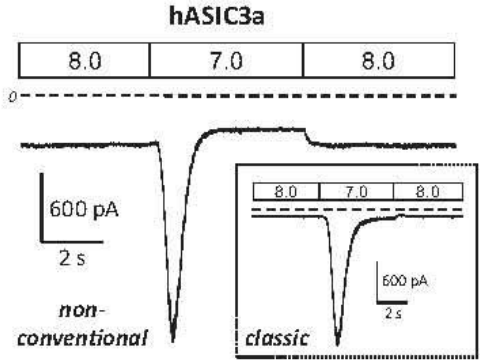


Fig. 2. Macroscopic properties of the human ASIC3 currents. Whole-cell recordings of hASIC3a currents performed at −80 mV from F-11 transfected cells. Currents were activated by rapid changes of the external pH from pH 8.0 to 7.0, as indicated above each current trace. Dashed lines represent the zero current level. The nonconventional current (main trace) and the classic current (*Inset*) are represented.

Human ASIC3a Channel Is a Sensor of Extracellular Alkalization. The amplitude and direction of both the classic and the nonconventional sustained hASIC3a current, measured as the difference between the plateau current obtained at pH ranging from 7.7 to 5.0 and the current level at the holding pH of 8.0 (Fig. 3*A*, *Inset*), were significantly different for pH values down to 6.6 (Fig. 3*A*). The nonconventional plateau currents were larger in amplitude and of opposite (i.e., positive) direction. This suggested that the nonconventional hASIC3a current was constitutively activated at pH 8.0; i.e., upon extracellular alkalization. Indeed, the basal current level at pH 8.0 in cells presenting a nonconventional hASIC3a sustained current was significantly larger than in cells exhibiting the classic current (Fig. 3*B*). Moreover, APETx2 largely reduced the pH 8.0–induced resting current (Fig. 3*B*, *Inset*), strongly suggesting the participation of hASIC3a in this activity. We next measured the membrane conductance (G) at different external pH values (Fig. 3*C*) by applying 10-mV depolarizations to cells expressing the nonconventional sustained current (Fig. 3*C*, *Inset*). Whole-cell membrane conductance significantly increased as the external pH was shifted from 6.6 to 8.0, supporting the idea of an alkaline pH-gated hASIC3a sustained current. Furthermore, the pH 8.0–activated membrane conductance was fully abolished by APETx2 (Fig. 3*C*), demonstrating that hASIC3a carries an alkaline-activated constitutive current in these cells. The hASIC3a alkaline-induced sustained current is highly dependent on external Na^+ ions (Fig. 3*D*). Indeed, the sustained current that developed at pH 8.0 under normal sodium condition (145 Na) was almost suppressed when external sodium was replaced by *N*-Methyl D-Glucamine (0 Na). This pH 8.0–induced Na^+-dependent current was inhibited by APETx2 (Fig. 3*D*). The I/V curve of the current sensitive to APETx2 (Fig. 3*E*, I_{APETx2}), obtained from a voltage ramp protocol on the different sustained current levels recorded at pH 8.0 (Fig. 3*D*, *Lower*), showed that the pH 8.0–induced hASIC3a current reversed at ~33 mV (n = 10). A decrease in the external Na^+ concentration from 145 to 45 mM led to a 30-mV shift (n = 4) of this reversal potential, which perfectly corresponded to the shift of the Na^+ ions reversal potential (theoretical E_{Na} varying from ~85 to ~55 mV at 20 °C, according to the Nernst equation). Although not as high as the classical acid-induced transient current (11), the human alkaline-sensitive current thus exhibits a significant Na^+ selectivity with a relative permeability of Na^+ to K^+ (PNa/PK) of 3.4.

Thus, the human ASIC3a channel has the original property to sense external pH in both directions (decrease and increase). It can generate a transient activation upon acidification, and a sustained, mainly Na^+ selective, current in response to alkalization.

Alkaline Sensitivity Is an Intrinsic Property of Human ASIC3. The alkaline-gated hASIC3a current was also observed in transfected COS-7 cells (Fig. 4*A*), injected *Xenopus* oocytes (Fig. 4*B*), as well as in transiently transfected mouse cortical neurons (Fig. 4*C*). The characteristics of the alkaline-induced sustained current were similar in the different expression systems (see *SI Results*). The alkaline sensitivity of hASIC3a was steep, with maximal current at pH 8.0, zero current level estimated around pH 6.5, and a Hill slope of 1.4 (Fig. 4*D*); i.e., smaller than that observed for the

NEUROSCIENCE

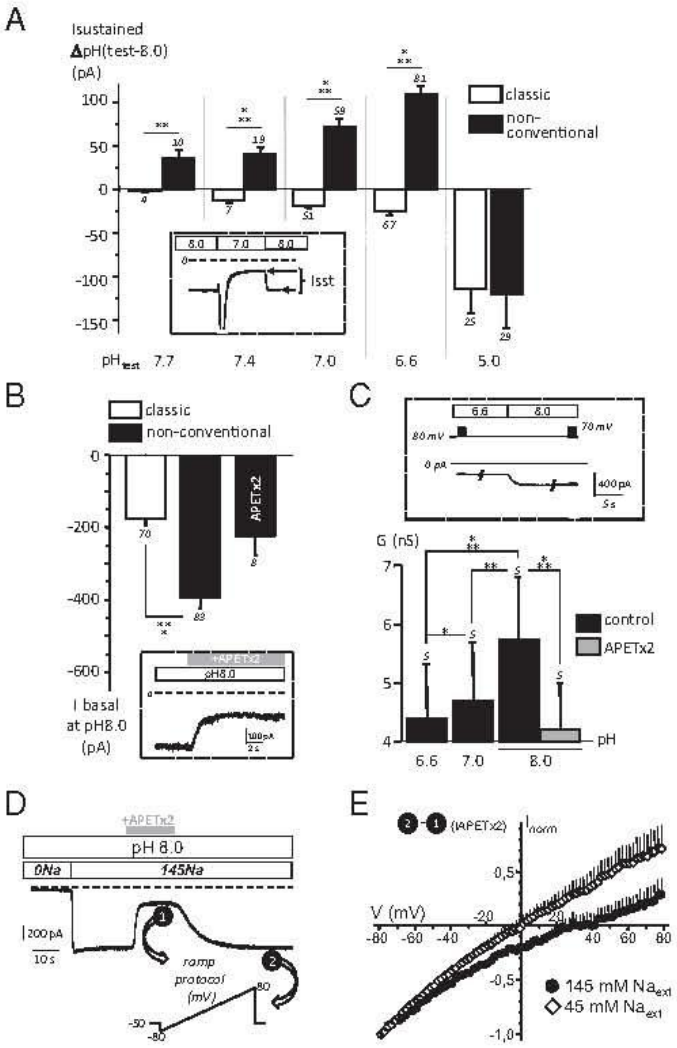


Fig. 3. Properties of the nonconventional hASIC3a sustained current in F11 cells. (*A*) Amplitudes of the hASIC3a sustained current component (Isst) for the classic (white bars) and nonconventional (black bars) currents recorded at different external pH (HP -80 mV). The amplitudes were measured as the difference between the current level reached at the test pH (7.7, 7.4, 7.0, 6.6, and 5.0) and the current level at the holding pH 8.0 (see *Inset*). The number of experiment is indicated above each bar (**$P < 0.01$ and ***$P < 0.001$, Mann–Whitney test). (*B*) Comparison of the amplitude of the basal current measured at the holding pH 8.0 in cells expressing the classic and the nonconventional hASIC3a currents (HP -80 mV, ***$P < 0.001$, Kruskal–Wallis test followed by a Dunn's post hoc test). As illustrated in the *Inset*, the APETx2 toxin at 1 μM inhibited the basal current in cells expressing the nonconventional hASIC3a current. (*C*) The macroscopic membrane conductances G, calculated from 10-mV pulses applied to cells expressing the nonconventional hASIC3a current (*Inset*), are represented as a function of external pH both in control conditions (black bars) and in the presence of the APETx2 toxin at 1 μM (gray bar; *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, and ***$P < 0.001$, repeated measures ANOVA test). (*D*) Sensitivity of the pH 8.0–induced hASIC3a current to extracellular Na^+ ions and APETx2 toxin (3 μM). The 0-Na condition was obtained by replacing external Na^+ by *N*-Methyl D-Glucamine ($NMDG^+$) ions. A voltage ramp protocol was applied to the current levels obtained in the presence (1) and in the absence (2) of APETx2 (3 μM). *E*, I/V curve of the pH 8.0–induced APETx2-sensitive hASIC3a current.

transient current activated by acidic pH (i.e., ~3.0, Fig. S2*B*). hASIC3b and hASIC3c, which generate classical acid-induced currents with properties similar to hASIC3a when expressed in *Xenopus* oocytes, were also activated when the external pH is shifted from 6.5 to 9 (see Fig. S3). The alkaline-induced current was blocked by amiloride (see Fig. S5*A*) and was not observed when rat ASIC3 or human ASIC1a were expressed in F-11 cells (Fig. 4*E*) or in *Xenopus* oocytes (see Fig. S3*F*), strongly suggesting that this property was tightly associated with hASIC3. ASIC3 can form heteromeric channels with ASIC1a in rodents (32), and hASIC3 mRNAs are often coexpressed with hASIC1 transcripts in human tissues (Fig. 1 and Fig. S1). We thus tested whether the heteromeric channel also displayed the alkaline-sensitivity. All of the oocytes expressing a heteromeric hASIC1a/hASIC3c channel ($n = 7$; see *SI Materials and Methods*) showed an alkaline-induced sustained current in addition to the classical transient inward current (see Fig. S3 *E* and *F*). Both the sustained and the transient currents were blocked by APETx2 (500 nM) with a potency (38%, $P < 0.01$ and 28%, $P < 0.05$, respectively) that is in good agreement with the effects of the toxin already described on rat ASIC3-containing heteromeric channels (32).

All together, these results show that the alkaline-sensitivity is an intrinsic and specific property of human ASIC3 channels. This property is probably not associated with the C-terminal domain that differs between the three hASIC3 isoforms.

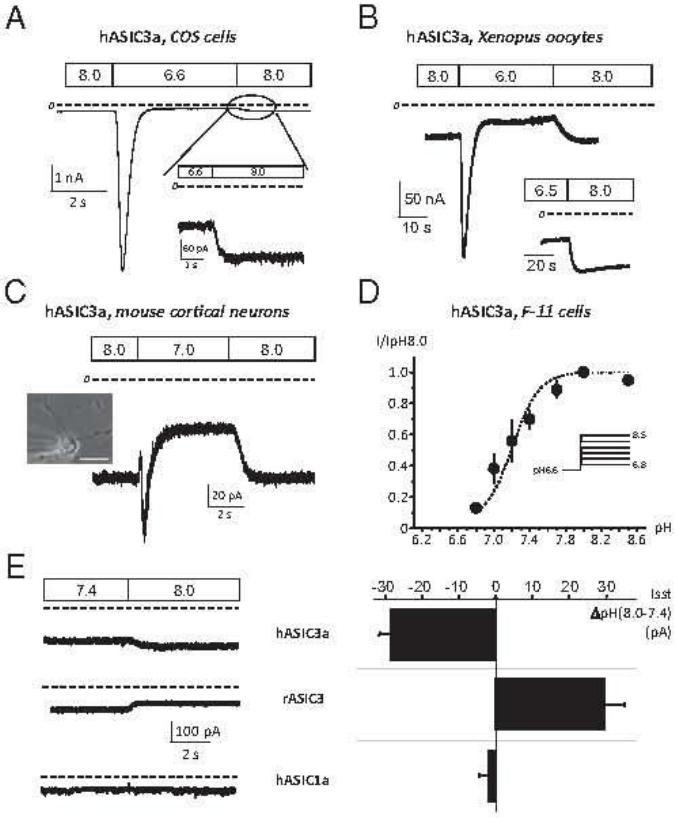


Fig. 4. The alkaline-induced sustained current is independent of the expression system. (*A*) pH 6.6–evoked current recorded at −80 mV from COS cells transfected with hASIC3a. The dotted line represents the zero current level, and the typical alkaline-induced sustained current is magnified. (*B*) *Xenopus* oocytes injected with hASIC3a also display a typical alkaline-induced sustained current. The two current traces were recorded at −80 mV from the same oocyte. (*C*) pH 7.0–evoked current recorded at −80 mV from a mouse cortical neuron transfected with hASIC3a. The current displays typical alkaline-induced sustained activity. (*D*) pH-dependent activation of the hASIC3a nonconventional sustained currents recorded in F-11 cells (data from five different cells). Amplitudes of the sustained currents are normalized to the current measured at pH 8.0 (I/IpH8.0). (*E*) Typical effects of extracellular alkalization to pH 8.0 (from the physiological pH 7.4) on whole-cell current recorded at −80 mV from F-11 cells expressing either hASIC3a, rASIC3, or hASIC1a channels. The alkaline-induced current was not observed in rASIC3- or hASIC1a-expressing cells. rASIC3 showed a small widow current at pH 7.4 that was absent at pH 8.0.

Two Arginine Residues in the Extracellular Loop Are Involved in the Alkaline Sensitivity of Human ASIC3a Channel. Our data strongly suggested that the sensitivity of hASIC3a to alkaline pH was directly supported by the channel itself. Therefore, we looked at the structural elements involved in the alkaline sensitivity of the channel using a site-directed mutagenesis approach (Fig. 5). An ASIC3 chimeric channel containing rat ASIC3 transmembrane and intracellular domains and human ASIC3a extracellular loop showed alkaline sensitivity (Fig. 5*A*, *Upper*); whereas, a human ASIC3a chimera containing the rat ASIC3 extracellular loop did not (Fig. 5*A*, *Lower*). The human and rat ASIC3 extracellular loops share a high percentage of homology (~90%), and we focused our attention on two arginine residues (R68 and R83) that are only present in the extracellular loop of the human isoforms (Fig. 5*B*). The arginine 68 is located at the junction between the transmembrane domain 1 (TM1) and the extracellular loop, a critical hydrophobic location that suggested an unusual pK_a for this arginine, which could be involved in alkaline pH sensing, similarly to what has been shown for two-pore domain alkali-activated K^+ channel (33). Arginine 83 is located at the junction between β1 and β2 linkers of the palm domain, a region that has recently been shown to control the sustained opening of ASIC1 (34). Single (R68G or R83Q) or dual (RR68,83GQ) mutations of those two arginine residues significantly reduced the amplitude of the alkaline-induced sustained current, compared with the wild-type hASIC3a current (Fig. 5 *C* and *D*). The transient current amplitudes at pH5.0 were not different between the mutants and the wild-type channels (Fig. 5*E*), showing a specific effect of the two arginine residues on the alkaline-induced current. Introducing these two arginine residues within the extracellular loop of the rat channel (GQ69,84RR mutant) induced a small alkaline sensitivity in 11 out of the 26 oocytes tested, although this mutant did not fully reconstitute the human properties (see Fig. S4*A*). These results demonstrate that the sustained activation of hASIC3a in response to extracellular alkalization is fully supported by the extracellular loop where the R68 and R83 residues are playing an important role.

Finally, it was possible to strongly reduce the acid sensitivity of the hASIC3 channel without affecting the alkaline-induced current (see Fig. S4*B*) by mutating two amino acids in the post-TM1 region that are crucial for H^+ gating (35) (hASIC3-HH71,72NN). Thus, our data suggest that it is possible to partially dissociate both functioning modes by mutating either arginines 68 and 83 or histidines 71 and 72.

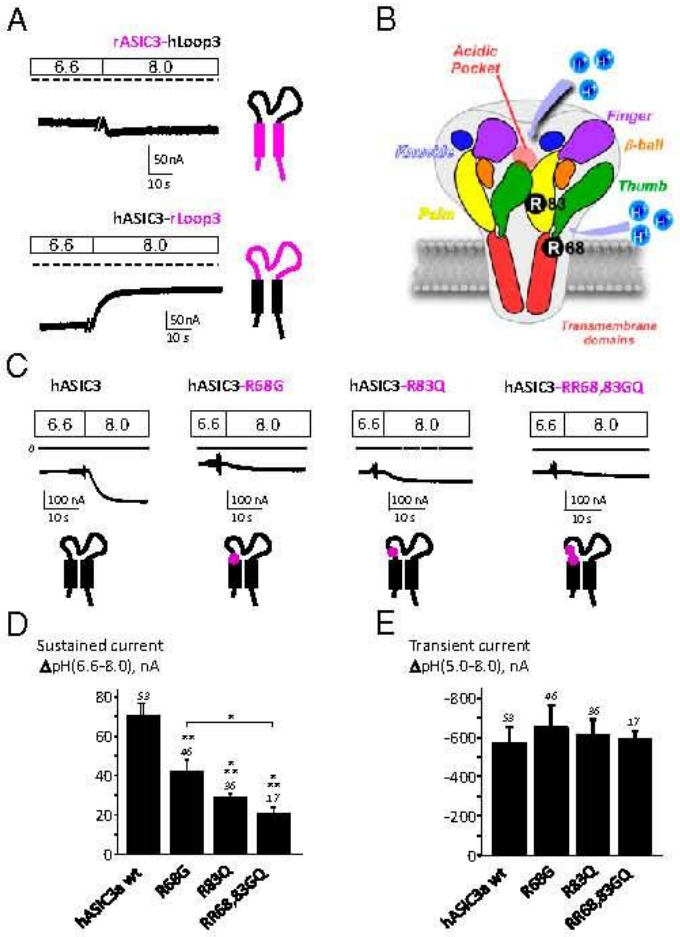


Fig. 5. Mapping of the structural elements involved in the alkaline sensitivity of hASIC3. (*A*) Effect of external alkalization (from pH 6.6 to 8.0) on oocytes expressing the rat ASIC3 chimera containing the extracellular loop of hASIC3a; (*Upper*) rASIC3-hLoop3 or the human ASIC3a chimera containing the extracellular loop of rASIC3; (*Lower*) hASIC3-rLoop3. (*B*) Schematic representation of two ASIC subunits in a functional channel. The two arginines only present in human ASIC3, and not found in rat, are indicated. Adapted by permission from ref. 4 (Copyright 2007, Macmillan Publishers Ltd). (*C*) Effect of external alkalization on hASIC3a wild type and mutants. (*D*) Bar graph representing the effects observe in (*C*) (*$P < 0.05$ and ***$P < 0.001$, one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test). (*E*) Bar graph of the amplitudes of the pH 5.0–induced transient currents measured from oocytes expressing the wild-type or the arginine mutants described in *C* and *D*.

Alkaline Current of hASIC3a Is Modulated by Calcium, Lactic Acid, and Arachidonic Acid. The alkaline sensitivity of hASIC3a is only observed in about half of the cells, suggesting the existence of regulatory mechanisms. We have evaluated the effect of several factors previously described that modulate rat ASIC3, including extracellular calcium, lactic acid, and arachidonic acid, on the alkaline sensitivity of hASIC3a. Extracellular calcium ions have been involved in the gating mechanism of ASIC3 by protons (36). We thus tested whether the alkaline sensitivity of hASIC3a was dependent on external calcium concentration. Changing the extracellular calcium concentration, from normal (2 mM) to high (10 mM) or low (1 μM) levels, did not induce any alkaline sensitivity in cells only displaying the conventional hASIC3a current; i.e., not sensitive to external alkaline pH ($n = 5$). However, the basal hASIC3a current recorded at pH 8.0 from cells displaying the alkaline sensitivity was modulated by changes of external calcium concentration (Fig. 6*A*). It was increased in low calcium conditions whereas it was reduced at high calcium concentrations, similarly to what was previously described for acid-induced rat ASIC3 current (36). Lactic acid, a potentiator of the rat ASIC3 current, which acts by lowering the concentration of Ca^{2+} and Mg^{2+} ions (17), also increased the alkaline-induced hASIC3a current (Fig. 6*B*).

Arachidonic acid (AA) is a well-known mediator of inflammation, which potentiates rat ASIC3 current (16, 19, 36). Over all of the hASIC3a-expressing F-11 cells tested ($n = 37$), 14 initially displayed an alkaline-induced sustained current when external pH was switched from 7.0 to 8.0 (see *Materials and Methods*). This alkaline-sensitive current was always potentiated by AA, as indicated by the effect on the basal current recorded at pH 8.0 (Fig. 6*C*, *Left*). The effect of AA was also observed in *Xenopus* oocytes injected with hASIC3a (Fig. S5*B*), but was absent in F-11 cells transfected with rat ASIC3 (Fig. 6*C*, *Right*). It is interesting to note that AA alone was sufficient to trigger a current at physiological pH 7.4 from cells displaying the alkaline sensitivity (Fig. 6*D*), and this AA-induced hASIC3a current was inhibited by APETx2 (Fig.6*D*, *Inset*). Moreover, AA was also able to induce, or unmask, the alkaline sensitivity in 10 of the 23 remaining cells (43%) that initially did not display an alkaline-induced current in response to a pH switch from 7.0 to 8.0 (Fig. 6*E*). Arachidonic acid, calcium, and lactic acid are thus

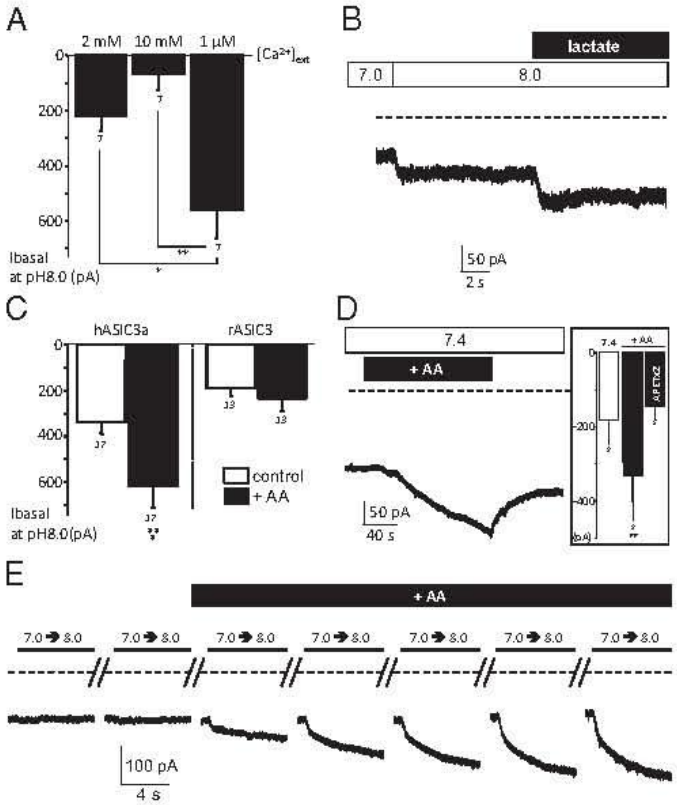


Fig. 6. Modulation of the hASIC3a alkaline-sensitive current. Whole-cell patch-clamp experiments performed on transfected F-11 cells clamped at −80 mV. (*A*) Effect of different external calcium concentrations on the basal sustained current recorded at pH8.0 in cells transfected with hASIC3a. The concentration of 1 µM free calcium was obtained by combining 5 mM EGTA and 4.97 mM $CaCl_2$ at pH 8.0, as calculated with the maxchelator software (*$P < 0.05$ and **$P < 0.01$, Friedman test followed by a Dunn's post hoc test). (*B*) Effect of lactate (20 mM) on the pH 8.0–induced hASIC3a sustained current. (*C*) Bar graph showing the potentiating effect of AA (10–20 µM) on the basal hASIC3a current recorded at pH 8.0 in cells displaying the alkaline sensitivity (*Left*; ***$P < 0.001$, Wilcoxon test). For comparison, the effect of AA of the basal current recorded at pH 8.0 from cells expressing rASIC3 is also represented (*Right*). (*D*) External application of AA (20 µM) was sufficient to trigger a hASIC3a current at physiological pH 7.4 in cells displaying the alkaline sensitivity. This AA-induced current was inhibited by APETx2 (5 µM, *Inset*). (*E*) Representative current trace showing the effect of arachidonic acid (10 µM) on a cell that initially displayed no pH 8.0–induced sustained current.

modulators of the hASIC3a alkaline-sensitive current, with a particularly potent effect of AA.

Discussion

In humans, ASIC3 has three splice variants and little is known about the molecular and biophysical properties of these channels. We found here that the ASIC3a variant represents the main ASIC3 mRNA in the human nervous system. The ASIC3c transcript is also present in nervous tissues but at a much lower level, and ASIC3b is barely detected. Our data show the presence of ASIC3 transcripts in human brain and spinal cord, which reinforces the idea that, conversely to the rat, the expression of human ASIC3 is not restricted to peripheral sensory neurons (10). These results suggest that hASIC3 may play a role in central neurophysiological functions although ASIC1 transcripts remain largely predominant in human brain. It is difficult to know to what extent hASIC channels are functionally expressed in central neurons. The only study of ASIC currents performed in cultured human cortical neurons exclusively reported the presence of ASIC1a-type currents (37). This does not preclude an expression of ASIC3 in other brain regions or neuronal subpopulations.

We demonstrate that all of the hASIC3 variants (i.e., hASIC3a, hASIC3b, and hASIC3c) have an original biophysical property that makes them capable to sense extracellular pH variations in both directions; i.e., acidification and alkalization. This original property never described for ASICs is supported by two distinct functioning modes of hASIC3, a classical transient mode in response to pH decrease, combined with a sustained mode in response to pH increase (see Fig. S6). The alkaline sensitivity appears to be a specific and intrinsic property of hASIC3 channels, and seems to be different, for instance, from the NH_4^+-induced ASIC currents described by Pidoplichko and colleagues (38). This property can be potentiated and /or induced by one or more "molecular switches," such as arachidonic acid, which is able to induce an hASIC3 current at physiological resting pH, and it may be associated with particular physiological or pathological conditions in the peripheral and central nervous system.

Sensitivity to alkalization is shared by other excitatory ion channels expressed in the sensory pathway, such as transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) (39, 40). TRPV1, like hASIC3, is activated by acidic pH in addition to alkaline pH (39). However, contrary to hASIC3, neither TRPV1 nor TRPA1 are directly activated by extracellular alkalization. They are activated by the secondary intracellular alkalization that follows extracellular application of high-pH solution. Accordingly, human ASIC3 directly senses extracellular alkalization via two arginine residues in its extracellular domain; R68, which is only present in human and primates, and R83, also found in a few other species, while TRPV1 and TRPA1 need residues in the N-terminal cytoplasmic domain (a histidine and two cysteines, respectively). This makes hASIC3 very sensitive to extracellular alkalization, with a maximal sustained depolarizing current reached around pH 8.0 and a Hill slope of 1.4. This channel appears therefore as a unique and very efficient sensor of extracellular acidification or alkalinization near the resting physiological pH.

Although it remains to be established whether acidic- and alkaline-pH activations of hASIC3 produce action potentials in human neurons, it is however possible to speculate, based on the experiments done in rodent neurons, that the fast and large depolarization generated by a rapid drop in extracellular pH will most probably lead to the generation of action potentials. On the other hand, the alkaline-activated current, which has slower kinetics and smaller amplitudes, will generate a long-lasting depolarization that would significantly modulate neuron excitability in response to other stimuli (sensitization). How neurons expressing hASIC3 can distinguish and integrate the different signals associated with external acidification or alkalization? This clearly depends on the presence or absence of the alkaline sensitivity, and on the amplitude, direction, and kinetics of the pH change within the tissue (see *SI Discussion*). It is also important to consider that the hASIC3 channel could fulfill different roles in different neuron populations and/or in different physiological conditions. This is further supported by the fact that the alkaline sensitivity is not always expressed but can be induced by factors such as AA and probably others that remain to be identified.

In sensory neurons, the human ASIC3 channels could therefore contribute to pain perception associated with both tissue acidosis, as in rodents, and tissue alkalization. Tissue alkalization, although less frequent than acidification, occurs in several physiological or pathophysiological situations including for instance hyperventilation, which produces peripheral nerves hyperexcitability as pCO_2 decline, and leads to paraesthesia (41), or the effusion of alkaline pancreatic fluids in patients having a pancreatic-pleural fistula that often causes chest pain (42).

Human ASIC3 can thus constitute a particularly efficient molecular sensor for alkalization and/or recovery from acidification in

neurons and other cell types where it may be expressed. Unveiling the biological conditions that control the alkaline sensitivity of this channel will certainly help to better understand the physiological consequences of this remarkable property.

Materials and Methods

F-11 and COS Cells Culture and Transfection. The F-11 cell line was grown as described previously (16). One day after plating, cells were transfected with either pIRES2-hASIC3a-HcRed, pIRES2-hASIC3a-EGFP, pIRES2-hASIC3b-EGFP, pIRES2-hASIC3c-EGFP, pIRES2-hASIC1-EGFP, or pIRES2-rASIC3-EGFP vectors using the JetPEI reagent according to the supplier's protocol (Polyplus Transfection SA). Fluorescent cells were used for patch-clamp recordings 2–4 d after transfection, and cells were considered as "hASIC3-positive" only when the transient current amplitude was at least 400 pA at pH 6.6 and/or 1 nA at pH 5.0 (i.e., $I_{pH5.0} > 400$ pA and/or $I_{pH5.0} > 1$ nA). Among these cells, we considered that an alkaline sensitivity was present only when the amplitude of the sustained current induced upon alkalization (pH 8.0) was of at least 10 pA (i.e., $I_{pH8.0} > 10$ pA).

Patch-Clamp Experiments. We used the whole-cell configuration 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 3-kHz low-pass filter (Krohn-Hite). Data were sampled at 10 kHz, digitized by a Digidata 1440 A-D/D-A converter (Axon Instruments) and recorded on a hard disc using pClamp software (version 10; Axon Instruments). Patch pipettes (1–4 MΩ) contained (in millimolars): 135 KCl, 2.5 Na_2-ATP, 2 $MgCl_2$, 2.1 $CaCl_2$, 5 EGTA, 10 Hepes (pH 7.25 with KOH). The control bath solution contained (in millimolars): 145 NaCl, 5 KCl, 2 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$, 10 Hepes, 10 glucose (pH 7.4 with NaOH). Mes was used instead of Hepes to buffer the solution pH, which ranged from 6 to 5 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 8.0) to an acidic (pH < 7.4) or an alkaline (pH > 7.4) test solution. Glucose (10 mM) was added to the control bath solution.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank M. Lazdunski for fruitful discussion and comments on the manuscript; A. Baron, S. Diochot, P. Inquimbert, and M. Christin for helpful discussion; and C. Chevance for secretarial assistance. We thank the Fondation pour la Recherche Medicale (FRM); the Association Française contre les Myopathies (AFM); the Agence Nationale de la Recherche (ANR); the Fédération pour la recherche sur le cerveau (FRC); and FIS PI08/0014, FIS PI11/01601, RD07/0062/0006 (Inst. Salud Carlos III, Spain), and 2009SGR869 (Gen. Catalunya) for financial support.

1. Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Heurteaux C, Lazdunski M (1997) A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* 386:173–177.
2. Deval E, et al. (2010) Acid-sensing ion channels (ASICs): Pharmacology and implication in pain. *Pharmacol Ther* 128:549–558.
3. Sluka KA, Winter OC, Wemmie JA (2009) Acid-sensing ion channels: A new target for pain and CNS diseases. *Curr Opin Drug Discov Devel* 12:693–704.
4. Jasti J, Furukawa H, Gonzales EB, Gouaux E (2007) Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 A resolution and low pH. *Nature* 449:316–323.
5. Bässler EL, Ngo-Anh TJ, Geisler HS, Ruppersberg JP, Gründer S (2001) Molecular and functional characterization of acid-sensing ion channel (ASIC) 1b. *J Biol Chem* 276:33782–33787.
6. Chen CC, England S, Akopian AN, Wood JN (1998) A sensory neuron-specific, proton-gated ion channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10240–10245.
7. Waldmann R, et al. (1997) Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na+ channel specific for sensory neurons. *J Biol Chem* 272:20975–20978.
8. Molliver DC, et al. (2005) ASIC3, an acid-sensing ion channel, is expressed in metaboreceptive sensory neurons. *Mol Pain* 1:35.
9. 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* 21:8026–8033.
10. Babinski K, Lê KT, Séguéla P (1999) Molecular cloning and regional distribution of a human proton receptor subunit with biphasic functional properties. *J Neurochem* 72:51–57.
11. 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* 433:257–260.
12. Ishibashi K, Marumo F (1998) Molecular cloning of a DEG/ENaC sodium channel cDNA from human testis. *Biochem Biophys Res Commun* 245:589–593.
13. Reeh PW, Steen KH (1996) Tissue acidosis in nociception and pain. *Prog Brain Res* 113:143–151.
14. Jones NG, Slater R, Cadiou H, McNaughton P, McMahon SB (2004) Acid-induced pain and its modulation in humans. *J Neurosci* 24:10974–10979.
15. Ugawa S, et al. (2002) Amiloride-blockable acid-sensing ion channels are leading acid sensors expressed in human nociceptors. *J Clin Invest* 110:1185–1190.
16. Deval E, et al. (2008) ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain. *EMBO J* 27:3047–3055.
17. Immke DC, McCleskey EW (2001) Lactate enhances the acid-sensing Na+ channel on ischemia-sensing neurons. *Nat Neurosci* 4:869–870.
18. 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.
19. Birdsong WT, et al. (2010) Sensing muscle ischemia: coincident detection of acid and ATP via interplay of two ion channels. *Neuron* 68(4):739–749.
20. 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* 99:501–509.
21. Salinas M, Lazdunski M, Lingueglia E (2009) Structural elements for the generation of sustained currents by the acid pain sensor ASIC3. *J Biol Chem* 284:31851–31859.
22. Deval E, et al. (2011) Acid-sensing ion channels in postoperative pain. *J Neurosci* 31:6059–6066.
23. Yen YT, et al. (2009) Role of acid-sensing ion channel 3 in sub-acute-phase inflammation. *Mol Pain* 5:1.
24. Price MP, et al. (2001) The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. *Neuron* 32:1071–1083.
25. Sluka KA, et al. (2007) ASIC3 in muscle mediates mechanical, but not heat, hyperalgesia associated with muscle inflammation. *Pain* 129:102–112.
26. 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* 25:10981–10989.
27. Page AJ, et al. (2005) Different contributions of ASIC channels 1a, 2, and 3 in gastrointestinal mechanosensory function. *Gut* 54:1408–1415.
28. Fromy B, Lingueglia E, Sigaudo-Roussel D, Saumet J-L, Lazdunski M (2012) Asic3 is a neuronal mechanosensor for pressure-induced vasodilation that protects against pressure ulcers. *Nat Med*, in press.
29. Wultsch T, et al. (2008) Deletion of the acid-sensing ion channel ASIC3 prevents gastritis-induced acid hyperresponsiveness of the stomach-brainstem axis. *Pain* 134:245–253.
30. Baron A, Waldmann R, Lazdunski M (2002) ASIC-like, proton-activated currents in rat hippocampal neurons. *J Physiol* 539:485–494.
31. Wemmie JA, et al. (2003) Acid-sensing ion channel 1 is localized in brain regions with high synaptic density and contributes to fear conditioning. *J Neurosci* 23:5496–5502.
32. Diochot S, et al. (2004) A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *EMBO J* 23:1516–1525.
33. Niemeyer MI, et al. (2006) Gating of two-pore domain K+ channels by extracellular pH. *Biochem Soc Trans* 34:899–902.
34. Springauf A, Bresenitz P, Gründer S (2011) The interaction between two extracellular linker regions controls sustained opening of acid-sensing ion channel 1. *J Biol Chem* 286:24374–24384.
35. Paukert M, Chen X, Polleichtner G, Schindelin H, Gründer S (2008) Candidate amino acids involved in H+ gating of acid-sensing ion channel 1a. *J Biol Chem* 283:572–581.
36. Immke DC, McCleskey EW (2003) Protons open acid-sensing ion channels by catalyzing relief of Ca^{2+} blockade. *Neuron* 37:75–84.
37. Li M, et al. (2010) Acid-sensing ion channels in acidosis-induced injury of human brain neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:1247–1260.
38. Pidoplichko VI, Dani JA (2006) Acid-sensitive ionic channels in midbrain dopamine neurons are sensitive to ammonium, which may contribute to hyperammonemia damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:11376–11380.
39. Dhaka A, et al. (2009) TRPV1 is activated by both acidic and basic pH. *J Neurosci* 29:153–158.
40. Fujita F, et al. (2008) Intracellular alkalization causes pain sensation through activation of TRPA1 in mice. *J Clin Invest* 118:4049–4057.
41. Macefield G, Burke D (1991) Paraesthesiae and tetany induced by voluntary hyperventilation. Increased excitability of human cutaneous and motor axons. *Brain* 114(Pt 1B):527–540.
42. Greenwald RA, Deluca RF, Raskin JB (1979) Pancreatic-pleural fistula: Demonstration by endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) and successful treatment with radiation therapy. *Dig Dis Sci* 24:240–244.

3. RESUME DE L'ETUDE ET DISCUSSION

Chez l'Homme, l'expression tissulaire, le rôle et les propriétés biophysiques et moléculaires de la protéine ASIC3 étaient jusqu'alors mal connues. Dans cette étude, nous avons montré qu'il existe chez l'Homme trois variants d 'épissage donnant trois isoformes protéiques ASIC3a, ASIC3b et ASIC3c. L'ARNm d'ASIC3a est le plus représenté dans les tissus nerveux humains, suivi d'ASIC3c, en plus faible quantité. ASIC3b est, lui, à peine détecté. De plus, contrairement à leur distribution dans le système nerveux de rat, les ARNm ASIC3 ne sont pas restreints au système nerveux périphérique chez l'Homme mais sont également exprimés dans le cerveau et la moelle épinière. Ces données suggèrent que les canaux ASIC3 pourraient jouer un rôle dans les fonctions neurologiques centrales, bien qu'il soit difficile de mettre en évidence l'activité spécifique des différentes formes d'ASIC dans les neurones centraux humains.

Dans ces travaux, nous avons découverts une propriété originale, jamais décrite jusqu'alors, qui confère aux trois types de canaux ASIC3 humains la possibilité de percevoir non seulement le pH acide mais également le pH alcalin. Cette propriété spécifique du canal humain semble due à deux modes de fonctionnement distincts : un mode transitoire classique répondant à l'acidose extracellulaire, et un mode soutenu répondant à l'alcalinisation du milieu. Cette sensibilité spécifique du canal humain n'est pas systématiquement observée. Toutefois, elle peut être déclenchée ou accentuée par l'acide arachidonique, ce qui génère un courant au pH physiologique. Cette sensibilité originale du canal ASIC3 humain pourrait conduire à des rôles particuliers du canal dans certaines conditions physiologiques ou pathologiques du système nerveux périphérique et central chez l'Homme.

C'est la première fois qu'une activation directe d'un canal par l'alcalose extracellulaire est démontrée. Nous avons mis en évidence dans ce mécanisme l'implication de deux résidus arginine présents sur la boucle extracellulaire du canal. L'arginine 68, uniquement présente chez l'Homme et les primates, et l'arginine 83, retrouvée dans quelques autres espèces. Jusque là, d'autres canaux, impliqués dans les voies de la douleur, avaient déjà été montrés comme étant des senseurs de l'alcalinisation, tels que TRPV1 (Dhaka et al, 2009) et TRPA1 (Fujita et al, 2008). Mais, ces canaux sont modulés par l'augmentation du pH intracellulaire consécutive à l'alcalose extracellulaire, via des résidus intracytoplasmiques. Le canal ASIC3 humain, via sa grande sensibilité aux protons et son mécanisme spécifique, devient un senseur privilégié de l'acidification et de l'alcalinisation lors de faibles variations autour du pH physiologique.

Bien qu'il soit difficile d'apprécier l'influence des courants ASIC3 sur l'excitabilité des neurones chez l'Homme, on peut penser, par analogie à ce qui a été décrit chez le rat, que la dépolarisation rapide et transitoire induite par les acidifications pourrait suffire à générer des potentiels d'action. Et, dans un autre temps, le courant lent et soutenu induit par l'alcalose, pourrait être à l'origine d'une dépolarisation neuronale constante, participant

ainsi à la sensibilisation neuronale. Toutefois, les courants ASIC3 humains étudiés ne présentent pas tous cette caractéristique particulière. On peut alors se demander si cette propriété est exprimée différemment selon le type de neurone, la maturité du neurone, les conditions physiologiques, physiopathologiques, ou encore la présence de certaines molécules, comme l'acide arachidonique qui peut induire cette spécificité. L'expression dans tout le système nerveux et les comportements variés des canaux ASIC3 humains pourraient conduire à des rôles divers chez l'Homme et probablement participer aux douleurs associées à des modulations du pH tissulaire dans les deux sens, acidification ou alcalinisation. D'autant que l'alcalinisation des tissus, bien que plus rare que l'acidification, est associée à certaines pathologies. C'est par exemple le cas des fistules pancréatiques, où l'alcalose est due au déversement de liquides pancréatiques dans la cavité abdominale et génère une douleur thoracique (Greenwald et al, 1979). L'hyperventilation peut également être à l'origine d'une alcalose, en raison d'une réduction de la pression partielle en CO_2, générant une augmentation du pH sanguin et pouvant conduire à des paresthésies (troubles de la sensibilité tactile, douloureuse ou thermique) (Macefield & Burke, 1991).

Pour conclure, la découverte d'une propriété unique et originale du canal ASIC3 humain laisse penser qu'il peut être un senseur fin des variations de pH dans le sens d'une acidification (pH devenant inférieur à 7,4) et dans le sens d'une alcalisation (pH devenant supérieur à 7,4). Toutefois, le canal pourrait sentir également un retour au pH physiologique (pH 7,4), c'est à dire l'augmentation d'un pH acide jusqu'à pH 7,4, ou une diminution d'un pH alcalin vers une valeur de pH physiologique. La mise en évidence de certaines conditions biologiques à l'origine de cette sensibilité particulière du canal ASIC3 dans les différents tissus où il est exprimé, que ce soit au niveau du système nerveux ou au sein d'autres organes, permettra de mieux comprendre ses fonctions physiologiques et ainsi d'appréhender sa propension a être une cible thérapeutique dans le traitement de maladies liées à des troubles du pH tissulaire.

C. REGULATION DES CANAUX IONIQUES ASIC3 DE RAT PAR UN LIPIDE PROVENANT DE LA DEGRADATION MEMBRANAIRE

1. CONTEXTE DE L'ETUDE

Les canaux ASIC3 sont impliqués dans les douleurs inflammatoires et sont fortement potentialisés par l'acide arachidonique (AA) (Deval et al, 2008). En fait, l'AA augmente la sensibilité du canal pour les protons. Il a même été suggéré que ce lipide puisse activer directement ASIC3 à pH physiologique (Deval et al, 2008). La recherche d'un ligand endogène, activateur des canaux ASIC, est intéressante, puisque seul le proton est connu comme activateur direct endogène. D'autre part, des études récentes ont mis en évidence que le GMQ, un composé synthétique, et l'agmatine, un métabolite de l'arginine, sont des activateurs directs des canaux ASIC3 (Li et al, 2010). L'ensemble de ces données suggère donc que ces canaux pourraient être activés par des ligands endogènes autres que les protons.

Suite à un dommage tissulaire, une ischémie, ou une inflammation (Gizurarson et al, 2012), la membrane cellulaire est lésée et les phospholipides qui la constituent sont dégradés en AA et LPL par les phospholipases A_2 (PLA_2) (Sevastou et al, 2013) (**Résultats 1, A**). Différents LPL existent : la lysophosphatidyl-choline (LPC), la lysophosphatidyl-éthanolamine (LPE), le lysophosphatidyl-inositol (LPI) et la lysophosphatidyl-sérine (LPS). La dégradation de la LPC produit à son tour l'acide lysophosphatidique (LPA) via l'action enzymatique de l'autotaxine (Sevastou et al, 2013).

Ces lipides sont présents dans différents types cellulaires (Sevastou et al, 2013), et leur concentration augmente lors des conditions inflammatoires (Secchi et al, 1979), (Ryborg et al, 1995). La LPC, majoritaire, est présente à 200-300 µM dans le plasma humain (Kishimoto et al, 2002), (Fuchs et al, 2012). Elle a été impliquée dans de nombreuses pathologies telles que le diabète, le cancer, l'arthrose et l'athérosclérose (Sevastou et al, 2013), (Fuchs et al, 2012). Les rôles de la LPC dans certaines pathologies inflammatoires sont variés. La LPC a tout d'abord été mise en évidence pour ses effets pro-inflammatoires (Secchi et al, 1979), (Ryborg et al, 1995), (Sevastou et al, 2013), (Ryborg et al, 2000), (Fuchs & Schiller, 2009), (Fuchs et al, 2012), (Tokumura et al, 2009). Des études ultérieures ont montré un rôle anti-inflammatoire de la LPC dans un modèle d'infection, où elle permettrait l'élimination bactérienne (Drobnik et al, 2003), (Yan et al, 2004). Les effets variés de la LPC dépendent de nombreux facteurs, tels que sa concentration, la composition de sa chaîne carbonée, mais également la composition enzymatique et protéique du milieu (Sevastou et al, 2013). Par exemple, la présence d'albumine séquestre l'activité de la LPC et l'autotaxine conduit à la dégradation de la LPC en LPA. La LPC a semblé essentielle au processus de développement des douleurs neuropathiques. L'injection de la LPC *in vivo* conduit à une démyélinisation qui provoque des douleurs neuropathiques telles que l'allodynie mécanique et l'hyperalgie thermique chez les rongeurs (Wallace et al, 2003), (Inoue et al, 2008c), (Nagai

et al, 2010). Ultérieurement, de nombreuses études ont mis en évidence un rôle, non pas de la LPC, mais de son métabolite, le LPA, dans ces douleurs neuropathiques (Renback et al, 1999), (Renback et al, 2000), (Inoue et al, 2004), (Fujita et al, 2007), (Inoue et al, 2008b), (Ahn et al, 2009), (Ma et al, 2009), (Ma et al, 2010), (Ueda, 2011). Les effets proalgiques de la LPA font intervenir divers mécanismes. La LPA altère physiquement les nerfs par dégradation de protéines constituant la myéline (Fujita et al, 2007). La LPA provoque des douleurs neuropathiques par activation de ses récepteurs couplés aux protéines G, LPA_1 (Inoue et al, 2004), (Xie et al, 2008), (Inoue et al, 2008c) et LPA_3 (Ma et al, 2009). De plus, l'injection de LPA induit une amplification de sa synthèse, qui implique une voie de signalisation comprenant ses récepteurs LPA_3 (Ma et al, 2009) ainsi que la microglie (Ma et al, 2010).

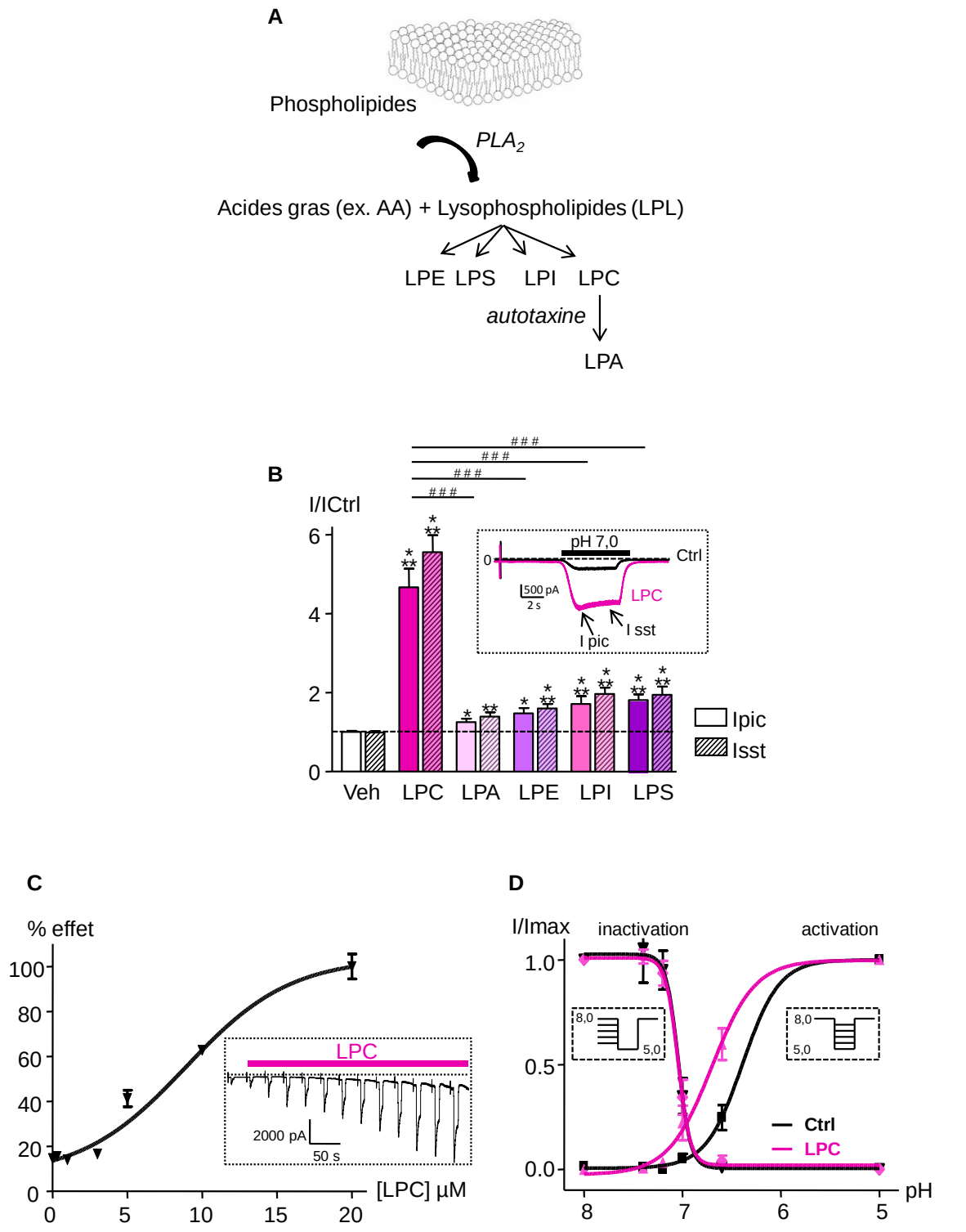
Des canaux ioniques, comme TRPV1 (Pan et al, 2010), (Nieto-Posadas et al, 2012), TREK-1 (Cohen et al, 2009), (Chemin et al, 2005), TREK-2 et TRAAK (Chemin et al, 2005), sont régulés par le LPA. Certains de ces canaux ont d'ailleurs été impliqués dans le développement des douleurs neuropathiques induites par le LPA (Pan et al, 2010), (Nieto-Posadas et al, 2012), (Cohen et al, 2009). Le LPA active les canaux TRPV1 dans un modèle de douleur de cancer osseux via la stimulation de la PKCε (Pan et al, 2010). Une étude récente montre que le LPA est capable d'activer directement le canal TRPV1, via la partie intra-cytoplasmique du domaine C terminal, générant des douleurs neuropathiques (Nieto-Posadas et al, 2012). Les effets du LPA sur les canaux TREK et TRAAK sont opposés selon le site d'action. En effet, le LPA intracellulaire active les canaux TREK-1, TREK-2 et TRAAK (Chemin et al, 2005), alors que le LPA extracellulaire réduit l'activité des canaux TREK-1 à des concentrations physiologiques (Cohen et al, 2009). De plus, les canaux TREK-1 et TRAAK sont activés par LPC extracellulaire mais d'une manière indirecte qui semble due à un effet de déformation membranaire (Maingret et al, 2000). Ces effets variés des LPL sur TREK-1 peuvent représenter des mécanismes de régulation ayant une cinétique d'intervention précise en réponse à des lésions et au cours des processus inflammatoires (conditions dans lesquelles les changements de pH et de niveaux de LPA extracellulaires et intracellulaires ne doivent pas être concomitants). D'autant plus que, selon les PLA_2 (cytosolique ou sécrétée), les LPL sont produits du côté interne ou externe, respectivement.

Les LPL issus de la dégradation membranaire, essentiellement le LPA, et la LPC dans une moindre mesure, ont des rôles importants dans l'initiation, le développement et/ou le maintien des douleurs neuropathiques. Certains canaux ioniques sont impliqués dans les mécanismes sous-jacents de ces douleurs. C'est pourquoi, connaissant le rôle des canaux ASIC3 dans la douleur et leur régulation par des médiateurs inflammatoires présents lors de lésions nerveuses, nous nous sommes intéressés aux rôles que pourraient avoir les LPL sur ce canal.

Dans cette dernière partie de ma thèse, mes travaux ont permis de:

- **Caractériser les effets sur les canaux ASIC des dérivés des lysophospholipides membranaires produits lors d'inflammation ou de lésion**
- **Identifier la LPC comme puissant potentialisateur de l'activité d'ASIC3 dans différents types cellulaires**
- **Démontrer que l'effet de la LPC n'est pas en faveur d'un effet de membrane**
- **Mettre en évidence une activation directe du canal ASIC3 par la LPC en condition de pH physiologique**
- **Etudier l'implication d'ASIC3 dans la douleur induite par la LPC chez le rat**

Cette étude n'a malheureusement pas pu être terminée avant la fin de ma thèse. Ainsi, seulement une partie des résultats de l'article en cours d'écriture est présentée ici.



Résultats 1 : Effets des lysophospholipides (LPL) sur le courant ASIC3 de rat induit par une acidification modérée du milieu extracellulaire (de pH 7,4 à pH 7,0).

A: Schéma représentatif de la formation des lysophospholipides et des acides gras suite à l'hydrolyse des phospholipides membranaires par la phospholipase A_2 (PLA_2).
Les lysophospholipides (LPL), varient selon leur tête polaire: éthanolamine (LPE), sérine (LPS), inositol (LPI) ou choline (LPC). La LPC via l'action enzymatique de l'autotaxine génère l'acide lysophosphatidique (LPA).

B: Effets des différents LPL sur le courant ASIC3 de rat exprimé dans les cellules F11.
*Patch Clamp en configuration cellule entière à –80 mV. Les amplitudes du pic de courant (Ipic) ou du courant soutenu (Isst) d'ASIC3 activé à pH 7,0 sont normalisées par rapport aux amplitudes des courants obtenus avant l'application des LPL ou du véhicule (Veh) (DMSO 0,1 %) (I/ICtrl). Les LPL sont appliqués dans le milieu extracellulaire pH 7,4 à 10 µM pendant 5 min (l'effet maximal est retenu). L'effet de chaque LPL est comparé à l'effet du véhicule (Veh) (*** P < 0,001). Test statistique de Mann Whitney. L'effet de chaque LPL est comparé à l'effet de la LPC (### P < 0,001). Test statistique de Kruskall Wallis et post test de Dunn's. (Ctrl n=13, LPC n=65, LPA n=18, LPE n=11, LPS n=17, LPI n=12).*
***Encart :** Effet de la LPC sur le courant ASIC3 à pH 7,0.*

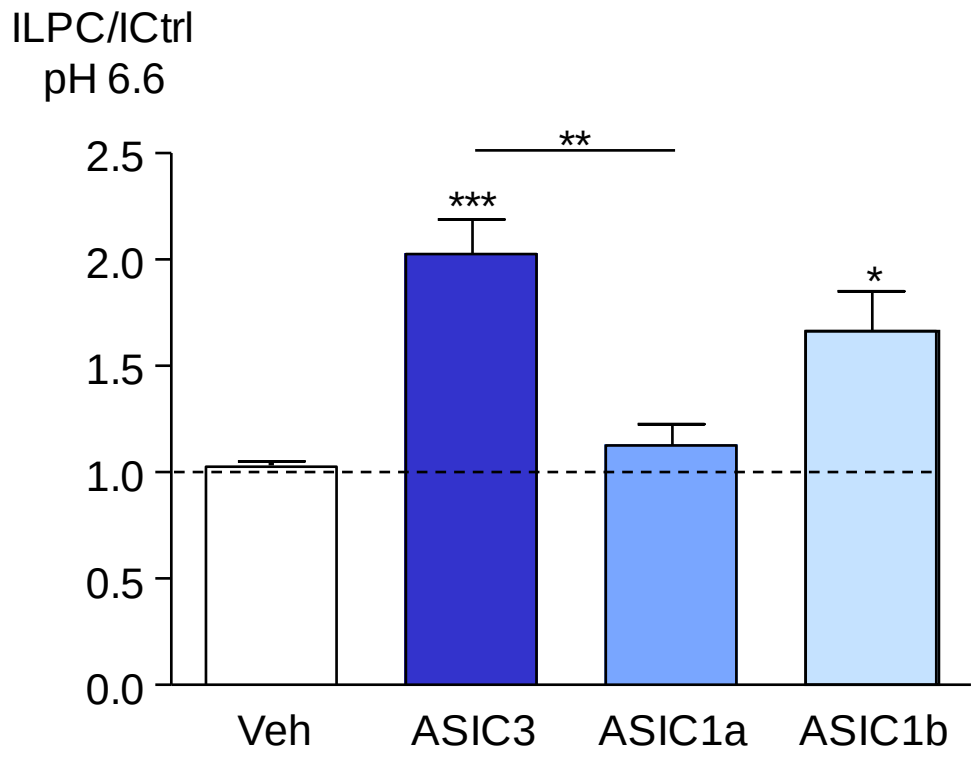
***C: Pourcentage d'effet de la LPC sur le courant ASIC3 transitoire (Ipic) induit à pH 7,0 en fonction de la concentration en LPC (dose-réponse)**(0,3 µM (n=2), 1 µM (n=7), 3 µM (n=5), 5 µM (n=2), 10 µM (n=72) et 20 µM (n=5)).*
***Encart:** Cinétique de l'effet de la LPC à 10 µM sur un courant ASIC3 activé à pH 7,0.*

D: Effet de la LPC (10 µM) sur l'activation/inactivation dépendante du pH du courant ASIC3.
Le pic de courant mesuré à différents pH est normalisé par rapport au pic maximal obtenu (pH 5,0). Les protocoles de stimulation qui permettent l'obtention des courbes d'activation et d'inactivation en fonction du pH extracellulaire sont représentés respectivement à droite et à gauche (encarts).

Lors d'une inflammation, l'activité des PLA_2 augmente et les phospholipides membranaires peuvent être dégradés en LPL et AA (Kudo & Murakami, 2002). Plusieurs LPL existent tels que le LPE, LPI, LPS et LPC, lui-même dégradé en LPA par l'autotaxine (**Résultats 1, A**).

Etant donné l'implication particulière d'ASIC3 dans l'inflammation, nous avons testé les effets des différents LPL sur l'activité de ces canaux. Pour cela, nous avons utilisés la technique de Patch Clamp en configuration cellule entière pour mesurer les courants (voltage imposé) ASIC3 de rat exprimés dans la lignée cellulaire F11. Les courants ASIC3 sont induits par l'acidification modérée du milieu extracellulaire (pH 7,0) à partir d'un pH de maintien 7,4.

Parmi les LPL (10 µM), la LPC présente les effets potentialisateurs les plus puissants sur les canaux ASIC3 (**Résultats 1, B**). Elle potentialise le pic de courant ASIC3 induit à pH 7,0 d'un facteur 4,67 $^{+}/_{-}$ 0,47, alors que les autres LPL (LPA, LPI, LPE et LPS) ont des effets potentialisateurs plus faibles compris entre 1,25 $^{+}/_{-}$ 0,08 et 1,81 $^{+}/_{-}$ 0,15 fois, mais néanmoins significatifs. Les effets sur le courant soutenu sont du même ordre de grandeur avec une augmentation par la LPC de 5,56 $^{+}/_{-}$ 0,43 fois et des autres LPL entre 1,39 $^{+}/_{-}$ 0,1 et 1,96 $^{+}/_{-}$ 0,16 fois. Les expériences de dose-réponse de la LPC ont permis de déterminer une EC_{50} autour de 9 µM (8,89 µM) (**Résultats 1, C**). L'encart des **Résultats 1, C**, indique que les effets de la LPC à 10 µM sur les courants ASIC3 augmentent au cours du temps et sont partiellement réversibles (non montré ici). Cet effet potentialisateur du courant ASIC3 est dû à un décalage de la courbe d'activation du canal vers des pH moins acides, alors que l'inactivation du canal n'est pas modifiée (**Résultats 1, D**). Ainsi, le canal peut devenir actif pour des pH proches des valeurs physiologiques. Les résultats suggèrent que la LPC serait capable d'activer directement le canal ASIC3 à pH physiologique, en absence d'acidose extracellulaire.



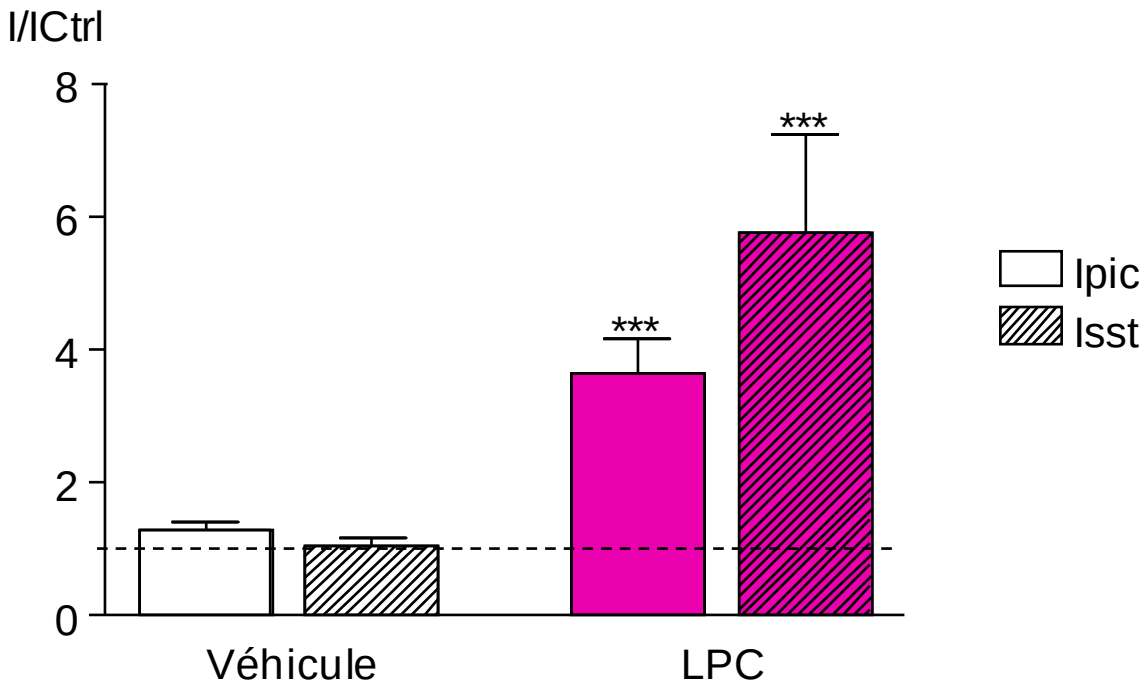
Résultats 2 : Effets de la LPC sur les courants ASIC3, ASIC1a et ASIC1b induits par une acidification (pH 6,6).

Les courants ASIC1a (n=6), ASIC1b (n=9) et ASIC3 (n=38) sont induits par une acidification du milieu extracellulaire (pH 6,6) à partir d'un pH de maintien de 7,4. La LPC 10 µM est appliquée dans le milieu extracellulaire pendant 5 min (la réponse maximale est retenue). Le pic de courant en présence de LPC est normalisé par rapport au pic de courant obtenu avant l'application de LPC ou en présence du véhicule (Veh) (ILPC/ICtrl). Test statistique de Kruskall Wallis, post-test de Dunn's (P < 0,05 ; ** P < 0,01 ; *** P < 0,001).*

Nous avons ensuite voulu savoir si la LPC est capable de potentialiser tous les courants ASIC. Pour cela, nous avons testé les effets de la LPC sur les courants ASIC1a et ASIC1b exprimés dans les cellules de la lignée F11 (**Résultats 2**). Les courants ASIC induits par une acidification du milieu extracellulaire (pH 6,6) sont mesurés par la technique de Patch Clamp, comme précisé précédemment. La LPC est appliquée dans le milieu extracellulaire à pH 7,4.

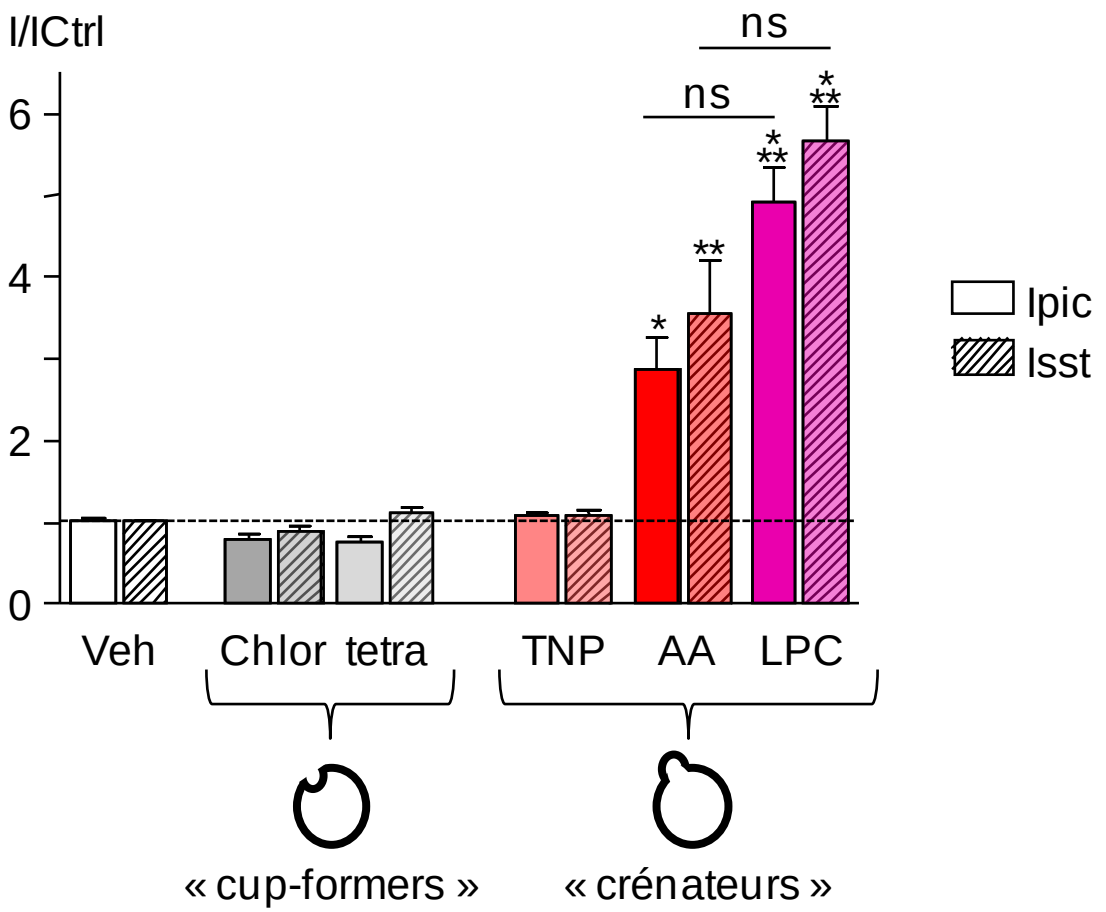
La LPC potentialise majoritairement les courants ASIC3 induits par l'acidose (pH 6,6), qui sont augmentés d'un facteur 2,03 $^{+}/_{-}$ 0,16. Elle potentialise également les courants ASIC1b (augmentation du courant de 1,67 $^{+}/_{-}$ 0,19 fois), mais de manière moins forte que les courants ASIC3. Enfin, la LPC a peu d'effet sur l'activité des canaux ASIC1a (augmentation du courant de 1,13 $^{+}/_{-}$ 0,09 fois). A noter que l'impact de la LPC est plus important sur les canaux ASIC3 activés par un pH modéré (pH 7,0) (**Résultats 1**) que par un pH plus acide (pH 6,6).

La potentialisation des courants ASIC3 par la LPC a été confirmée dans la lignée COS (**Résultats 3**). Cela permet de s'assurer que ces effets ne sont pas dus à des propriétés, ou des spécificités des cellules de la lignée F11. Les cellules COS sont transfectées avec les ADN codant les canaux ASIC3 de rat. Les courants ASIC3 sont induits par une acidification modérée (pH 7,0). La LPC augmente le pic de courant développé à pH 7,0 de 3,66 $^{+}/_{-}$ 0,49 fois et le courant soutenu de 5,77 $^{+}/_{-}$ 1,46 fois, ce qui est significativement supérieur aux effets du véhicule et comparable aux effets observés dans la lignée F11.



Résultats 3 : Effets de la LPC sur les courants ASIC3 induits par une acidification modérée (pH 7,0), dans les cellules COS.

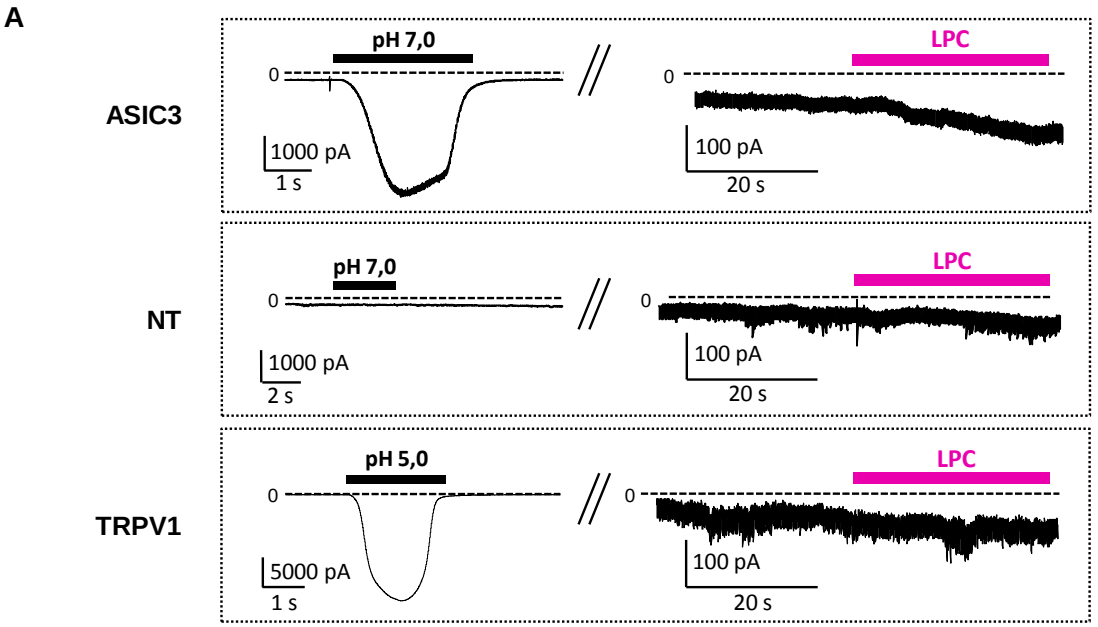
*Les courants ASIC3 sont mesurés dans les cellules COS transfectées. (Patch Clamp, configuration cellule entière, à -80 mV). Le courant, induit par un pH extracellulaire de 7,0 à partir d'un pH de maintien de 7,4 est normalisé par rapport au pic à pH 7,0 dans les conditions contrôle (n=7). L'application de LPC (10 µM) se fait dans le milieu extracellulaire à pH 7,4 pendant 1 min (n=8). Test statistique de Mann Whitney (*** P < 0,001).*

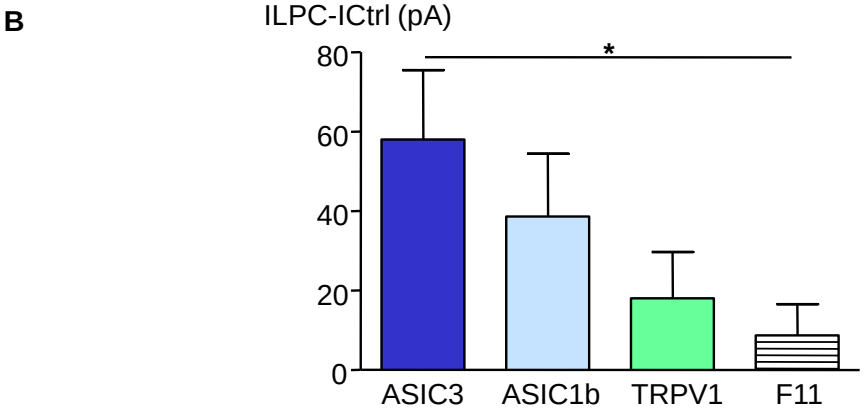


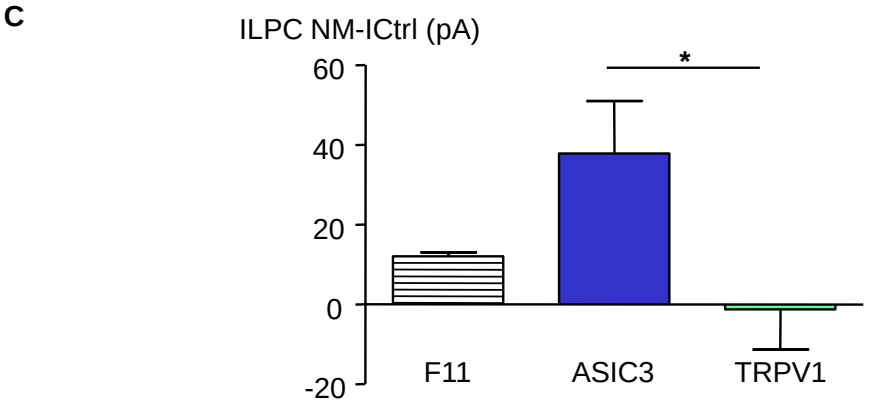
Résultats 4 : Effets de déformateurs membranaires sur les courants ASIC3 induits par une acidification modérée (pH 7,0).

Les canaux ASIC3 de rat sont exprimés dans les cellules F11. Le pic de courant et le courant soutenu d'ASIC3 induit à pH 7,0 en présence des différents déformateurs de la membrane plasmique, « crénateurs » et « cup-formers », sont normalisés par rapport aux courants obtenus avant l'application des différents composés pendant plusieurs minutes (I/ICtrl). (Veh : véhicule ; Chlor : chlorpromazine ; tetra : tétracaïne ; TNP : trinitrophénol ; AA : acide arachidonique ; LPC : lysophosphatidylcholine). Test statistique de Kruskall Wallis (P < 0,05 ; ** P < 0,01 ; *** P < 0,001 ; ns : non significatif).*

Afin de savoir si l'effet potentialisateur de la LPC est dû à une interaction directe avec le canal ASIC3, et non à un effet lié à la déformation membranaire j'ai testé différents modulateurs de la courbure membranaire (**Résultats 4**). Les « cup-formers », s'insérant dans le feuillet interne de la membrane plasmique, forment des creux. Ces molécules n'ont pas montré d'action significative sur l'activité des courants ASIC3 exprimés dans les cellules F11 induits à pH 7,0 (effets comparés au courant en présence du véhicule, compris entre 0,76 $^{+}/_{-}$ 0,05 et 0,80 $^{+}/_{-}$ 0,04 sur le pic de courant et 0,89 $^{+}/_{-}$ 0,05 et 1,11 $^{+}/_{-}$ 0,06 concernant le courant soutenu). Les « crénateurs » s'insèrent dans le feuillet externe de la membrane plasmique et forment des créneaux dans celle-ci. Parmi ces molécules, l'AA et la LPC sont les seules à potentialiser l'activité du canal, avec une augmentation du pic de courant de 2,86 $^{+}/_{-}$ 0,41 et 4,91 $^{+}/_{-}$ 0,44 fois respectivement. Le courant soutenu est augmenté de 3,54 $^{+}/_{-}$ 0,65 et 5,66 $^{+}/_{-}$ 0,44 fois. Le TNP n'a lui aucune action sur l'activité des canaux ASIC3 que ce soit sur le pic de courant (1,07 $^{+}/_{-}$ 0,06) ou sur le courant soutenu (1,10 $^{+}/_{-}$ 0,07). Ainsi, ces résultats suggèrent le mode d'action de la LPC n'est pas en faveur d'un effet de membrane puisque les autres déformateurs membranaires, à l'exception de l'AA dont on connaît déjà l'effet sur ASIC3 (Deval et al, 2008), n'ont que peu ou pas d'effet sur l'activité du canal ASIC3 activé par le pH.







Résultats 5 : Effets de la LPC sur les courants ASIC3 et TRPV1 au pH physiologique.

A: Effets de la LPC (10 µM) à pH 7,4 dans les cellules F11, transfectées ou non (NT) avec les canaux ASIC3 ou TRPV1. *Les courants sont enregistrés en Patch Clamp, en configuration cellule entière, à un potentiel de maintien de -80 mV. L'expression des canaux ASIC3 et TRPV1 est vérifiée par un saut de pH en début d'enregistrement (respectivement pH 7,0 et pH 5,0) (partie gauche). La LPC est perfusée à pH physiologique (pH 7,4) pendant 30 s (partie droite).*

B: Histogramme représentant l'amplitude moyenne des courants ASIC3 et TRPV1 générés par la LPC dans les cellules F11. *Les cellules sont transfectées avec l'ADN codant ASIC3 de rat (rASIC3) (n=16), TRPV1 (n=6) ou ne sont pas transfectées (NT) (n=9). Les courants sont mesurés après 30 s d'application de la LPC dans le milieu extracellulaire pH 7,4. (Test statistique de Kruskall Wallis (* P < 0,05)).*

C: Effets de la LPC non métabolisable (LPC NM) sur le courant basal à pH 7,4. *L'expérience est réalisée dans les cellules F11 non transfectées (NT) (n=2), exprimant ASIC3 (n=21) ou TRPV1 (n=9). La LPC NM est appliquée 30 s dans le milieu extracellulaire à pH 7,4. (Test statistique de Kruskall Wallis, post-test de Dunn's (* P < 0,05)).*

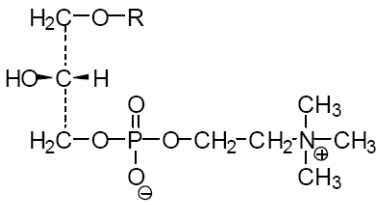
La LPC est donc un puissant potentialisateur de l'activité d'ASIC3. Elle semble interagir directement avec le canal et elle produit un décalage de la courbe d'activation dépendante du pH vers des valeurs proches du pH physiologique. Ces résultats suggèrent donc que la LPC pourrait activer directement les canaux ASIC3 sans aucune variation du pH extracellulaire (**encart Résultats 1, C,** et **Résultats 1, D**).

Afin de savoir si la LPC est capable à elle-seule d'activer les canaux ASIC3, nous avons mesuré les courants dans les cellules de la lignée F11 transfectées, soit avec ASIC3, soit avec TRPV1, et comparé les résultats avec ceux obtenus pour des cellules non transfectées. Les courants sont mesurés par la technique de Patch Clamp (Voltage imposé, à -80 mV), en configuration cellule entière. Le pH du milieu extracellulaire est maintenu à une valeur physiologique (pH 7,4) lors du test des effets de la LPC. Des tests pour vérifier l'expression des canaux ASIC3 et TRPV1 dans les cellules sont effectués en tout début d'expérience. L'activité des canaux ASIC3 est vérifiée par une acidification modérée à pH 7,0. L'activité des canaux TRPV1 est vérifiée par une acidose plus forte (pH 5,0). La LPC est appliquée dans le milieu extracellulaire au pH physiologique (pH 7,4).

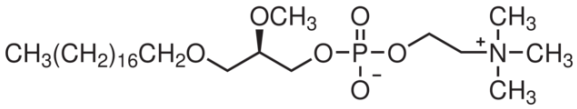
Au pH physiologique, l'application de la LPC (10 µM) pendant 30 s génère un courant dans les cellules F11 exprimant ASIC3 (58,06 $^{+}/_{-}$ 17,45 pA), mais ne génère pas de courant significatif aussi bien dans les cellules non transfectées (8,67 $^{+}/_{-}$ 7,88 pA) (**Résultats 2, A, B**), que dans celles exprimant les canaux TRPV1 (21,20 $^{+}/_{-}$ 13,75 pA). Afin de s'assurer d'un effet propre de la LPC, et de s'affranchir d'un éventuel effet dû à sa dégradation en LPA, l'action de la LPC non métabolisable (LPC NM) a été testée (**Résultats 6, A**). La LPC NM à 10 µM pendant 30 s permet le développement d'un courant à pH physiologique uniquement dans les cellules qui expriment les canaux ASIC3 (37,81 $^{+}/_{-}$ 13,15 pA), contrairement à celles non transfectées (12,00 $^{+}/_{-}$ 1,00 pA) ou à celles exprimant TRPV1 (-1,22 $^{+}/_{-}$ 10,16 pA). Ce courant est similaire à celui observé avec la LPC « classique » suggérant un effet propre de la molécule, et non dû à l'action de son métabolite, le LPA. Connaissant l'effet activateur du LPA sur TRPV1, on peut alors émettre l'hypothèse que le léger effet (non significatif) de la LPC sur ce canal (**Résultats 2, A, B**) peut être dû à sa dégradation. En effet, lors d'applications plus longues (1 min), cette tendance, non significative, s'accentue pour les canaux TRPV1 avec des valeurs de 225,56 $^{+}/_{-}$ 122,3 pA, contre 281,1 $^{+}/_{-}$ 87,58 pA pour ASIC3 (voir **Résultats 6**).

Si au bout de 30 s la LPC n'active pas significativement les canaux TRPV1 (**Résultats 5, A**), un effet plus prolongé (1 min) tend à augmenter l'activité de ces canaux (passant de 21,20 $^{+}/_{-}$ 13,75 pA au bout de 30 s (**Résultats 5, B**) à 225,6 $^{+}/_{-}$ 122,3 pA au bout de 1 min (**Résultats 6, A**)). De manière intéressante, la LPC NM appliquée pendant 60 s, ne permet pas l'activation du courant TRPV1. Ainsi, connaissant l'effet du LPA sur les courants TRPV1 (Pan et al, 2010), (Nieto-Posadas et al, 2012), on peut penser que l'action lors d'une application de la LPC sur ces canaux est le résultat de la dégradation de la LPC en LPA.

A

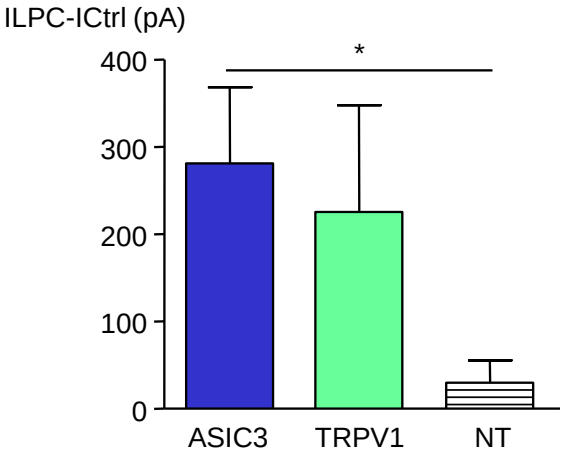


L-α-lysophosphatidylcholine

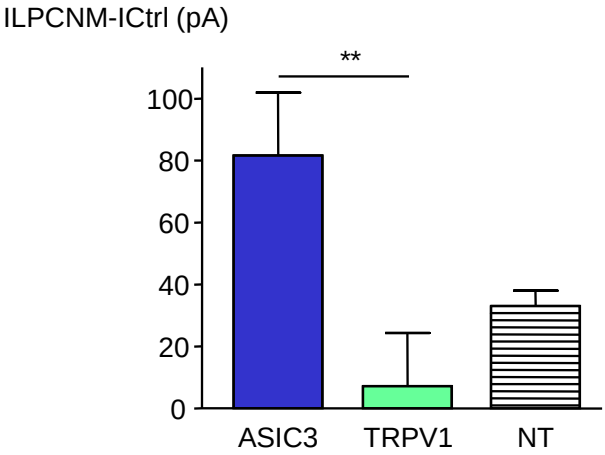


1-O-Octadecyl-2-O-methyl-*sn*-glycero-3-phosphorylcholine

B



C



Résultats 6 : Effets de la LPC et de la LPC NM sur les courants ASIC3 et TRPV1 à pH physiologique après 60 s d'application.

A : Formules développées de la LPC et de la LPC NM.

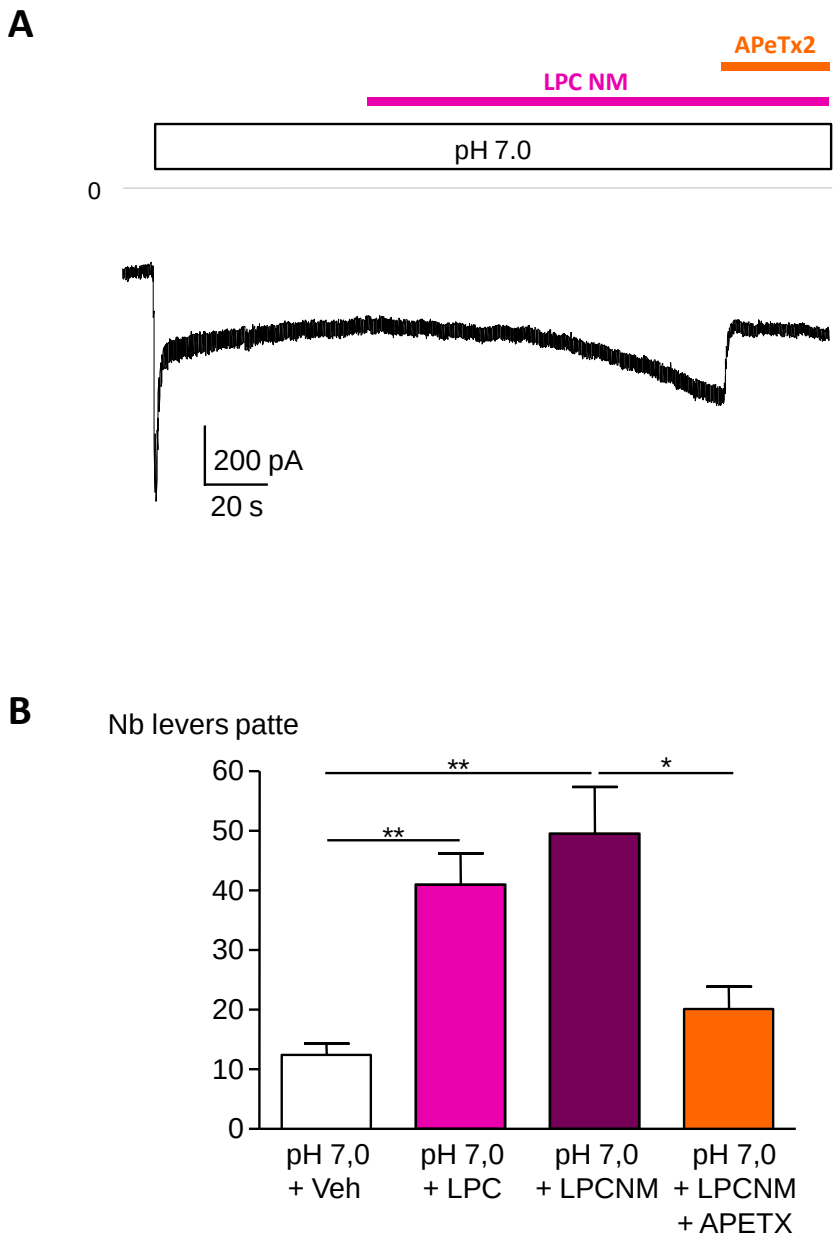
En haut est représentée la formule développée de la LPC ou L-α-lysophosphatidylcholine. En bas, celle de la LPC NM ou 1-O-Octadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine qui est un analogue non métabolisable de la LPC. Ce lipide bioactif a de multiples cibles enzymatiques, il inhibe notamment la synthèse de phosphatidylcholine.

B : Effets de la LPC 10 µM sur ASIC3 et TRPV1, appliquée pendant 60 s dans le milieu extracellulaire à pH 7,4.

Les courants sont mesurés en Patch Clamp, en configuration cellule entière, au potentiel de maintien de -80 mV. Les cellules F11 expriment rASIC3 (n=13), TRPV1 (n=5) ou ne sont pas transfectées (NT) (n=8).

C : Effets de la LPC NM 10 µM sur ASIC3 et TRPV1, appliquée pendant 60 s dans le milieu extracellulaire à pH 7,4.

ASIC3: n=11; TRPV1: n=9; NT: n=2. Tests statistiques de Kruskall Wallis; post tests de Dunn's (P < 0,05; ** P < 0,01).*



Résultats 7 : Effets combinés de la LPC et de l'acidité modérée (pH 7,0) sur l'activité des canaux ASIC3 *in vitro* et *in vivo* chez les rats.

A : Effets de la LPC NM et de la toxine APETx2 sur le courant soutenu d'ASIC3 induit à pH 7,0 dans les cellules F11 transfectées.

Le milieu extracellulaire à pH 7,0 contenant de la LPC NM (10 µM) est appliqué pendant 1 min 50 s, puis l'APETx2 (5 µM) est ajoutée durant 35 s.

B : Effets de la LPC et de la LPC NM avec ou sans toxine APETx2 in vivo chez les rats.

Le véhicule (Veh), la LPC (60 µM), la LPC NM (60 µM) avec ou sans toxine APETx2 (10 µM) sont injectés en sous-cutané sur le dessus de la patte arrière droite de rats (20 µL ; NaCl 0,9 %, Hepes 20 mM à pH 7,0). Le comportement douloureux est mesuré en comptant le nombre de fois où l'animal lève la patte injectée pendant les 20 min qui suivent l'injection.

(Véhicule : n=8 ; LPC : n=13 ; LPC NM : n=16 ; LPC NM + APETx2 : n=5). Tests statistiques de Mann Whitney (P < 0,05 ; ** P < 0,01).*

L'activation et/ou la potentialisation de l'activité des canaux ASIC3 au niveau périphérique provoque un comportement douloureux chez l'animal (Deval et al, 2008), (Yu et al, 2010), (Sluka et al, 2003; Sluka et al, 2013). Etant donné les effets de la LPC et de la LPC NM observés *in vitro* sur le canal ASIC3, nous avons voulu savoir si ces molécules ont des effets *in vivo*. Pour cela, nous avons effectué des tests comportementaux sur les rats. Ces tests ont consisté en des injections sous-cutanées de LPC, de LPC NM ou du véhicule, sur des rats mâles Wistar âgés de 6 à 8 semaines (Charles River) et des mesures du comportement douloureux provoqué par ces injections (test de « flinching »). Les animaux sont hébergés dans l'animalerie une semaine avant les expérimentations, et ont un accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau. Des habituations avec les expérimentateurs et le matériel expérimental sont réalisées la veille de l'expérience afin de minimiser le stress de l'animal. Nous avons injecté sous la peau de la patte arrière droite des rats, des solutions salines à pH 7,0 (NaCl 0,9 %, Hepès 20 mM) en présence de véhicule (0,1 % DMSO), de LPC ou de LPC NM. La toxine APETx2, qui bloque l'activité des canaux ASIC3 (Diochot et al, 2004), a été utilisée (co-injection avec la LPC NM) afin de démontrer l'implication de ces canaux dans les comportements observés. Nous avons ensuite mesuré le comportement douloureux des animaux en comptant le nombre de fois où l'animal lève la patte injectée pendant les 20 min qui suivent l'injection. Les rats vigiles sont maintenus en légère contention durant l'injection puis sont placés dans des cages d'observation où ils sont libres de leurs mouvements pendant les 20 min de l'expérience.

Tout d'abord, nous avons mesuré, en électrophysiologie, l'effet de la LPC NM et de la toxine APETx2 sur le courant ASIC3 soutenu induit à pH 7,0, dans les cellules F11 transfectées. Comme vous pouvez le voir sur la partie **A** des **Résultats 7**, la LPC NM potentialise le courant ASIC3 soutenu induit à pH 7,0. De plus, l'ajout de la toxine APETx2 inhibe totalement cet effet potentialisateur.

Les résultats comportementaux obtenus montrent que la LPC et la LPC NM potentialisent fortement la douleur induite par l'injection de solution à pH 7,0 (**Résultats 7, B**). Cette douleur se traduit par une augmentation du nombre de fois où l'animal lève la patte injectée. En effet, lors de l'injection du véhicule, les animaux lèvent la patte en moyenne 12,44 $^{+}/_{-}$ 1,91 fois durant 20 min. Lorsque la LPC ou la LPC NM sont injectées, les animaux lèvent respectivement 40,96 $^{+}/_{-}$ 5,26 ou 49.53 $^{+}/_{-}$ 7,84 fois la patte en 20 min. La co-injection de la toxine APETx2 réduit ce comportement douloureux d'un facteur deux, avec un score de 20,10 $^{+}/_{-}$ 3,80 durant 20 min. Cette réduction significative traduit un effet analgésique de la toxine, probablement via l'inhibition des canaux ASIC3.

Ainsi, cette première étude comportementale a permis de montrer un effet proalgique de la LPC et de son analogue non métabolisable (LPC NM) *in vivo* chez les rats dans un contexte d'acidose modérée (pH 7,0). De plus, le rôle analgésique de la toxine APETx2 suggère l'implication d'ASIC3 dans ce phénomène.

3. DISCUSSION ET CONCLUSION DE L'ETUDE

Dans cette étude, j'ai en premier mis en évidence l'effet potentialisateur de la LPC sur le canal ASIC3. En effet, la LPC augmente fortement le courant ASIC3 induit par une acidification modérée (pH 7,4 à 7,0). Cet effet ne semble pas être une conséquence de la déformation membranaire puisque l'application de différentes molécules connues pour déformer la membrane plasmique en formant des « créneaux » (« crénateurs ») ou des « creux » (« cupformers »), n'a pas eu d'effet significatif. Toutefois, il est difficile de conclure à un effet direct de la LPC sur le canal ASIC3 à ce stade de l'étude. Pour apporter des informations supplémentaires, des expériences de Patch excisé devront notamment être effectuées. Elles permettraient notamment de préciser si la LPC est capable d'activer directement le canal unitaire. Cependant, le fait que la LPC potentialise le courant ASIC3 de manière rapide dès les premières secondes d'application, est un argument supplémentaire en faveur d'un effet direct.

La LPC ne modifie pas l'inactivation du canal mais décale la courbe d'activation vers des pH proches du pH physiologique. Par ailleurs, les expériences d'électrophysiologie en condition de pH physiologique (pH 7,4), ont montré que l'application de la LPC dans ces conditions active un courant dans les cellules exprimant les canaux ASIC3, contrairement aux cellules non transfectées. Parmi les ASIC, le canal ASIC3 semble pour l'instant avoir un rôle privilégié en tant qu'effecteur de la LPC. Toutefois, des expériences supplémentaires doivent être réalisées afin de s'assurer du rôle de la LPC sur les différents ASIC, en condition de pH physiologique notamment. De plus, la LPC ne semble pas activer les canaux TRPV1, que l'on sait modulés par le métabolite de la LPC, le LPA. En effet, ce canal, contrairement à ASIC3 n'est pas activé par la LPC de manière rapide mais au bout de plusieurs dizaines de secondes suggérant un effet dû à un métabolite de la LPC, le LPA. Pour démontrer cette hypothèse, j'ai testé l'action d'une forme de LPC non métabolisable, qui ne produit pas de LPA. Cette molécule est capable d'induire un courant dans les cellules exprimant ASIC3 mais pas dans celles exprimant TRPV1 ni dans les cellules non transfectées. Ces résultats sont donc en faveur d'une action spécifique de la LPC sur ASIC3 et non sur TRPV1.

Enfin, les tests comportementaux, réalisés chez les rats, ont permis de mettre en évidence un effet *in vivo* de la LPC, capable de générer une douleur, via une action qui semble, au moins en partie, impliquer les canaux ASIC3. L'injection sous-cutanée de LPC en condition d'acidose modérée génère une douleur aiguë chez les rats. De plus, la LPC non métabolisable présentant les mêmes effets *in vivo* que la LPC, cela suggère un effet propre de la LPC et non un effet de ses métabolites. En présence d'APETx2, la douleur est réduite de manière significative, suggérant un effet algésique « passant par » par les canaux ASIC3. Toutefois, les études doivent être complétées par des traitements avec la LPC et la LPC NM en association avec, soit l'utilisation d'oligonucléotides antisens pour bloquer l'expression des canaux ASIC3 *in vivo,* soit l'utilisation des souris invalidées pour ASIC3.

Pour conclure, cette étude a pu révéler l'existence d'un « nouvel » activateur endogène des canaux ASIC3, autre que les protons, qui constituaient les seuls activateurs endogènes connus à ce jour. Le rôle des canaux ASIC, et ASIC3 en particulier, a été amplement démontré dans les douleurs inflammatoires ou liées à une inflammation (Deval et al, 2008). Or, l'AA et les LPL sont largement présents dans ces conditions (Fuchs et al, 2009; Fuchs et al, 2012; Fuchs & Schiller, 2009). Ils pourraient être des acteurs clés du développement de la douleur via une activation/potentialisation des canaux ASIC3. Par la suite, il serait intéressant de tester les effets combinés de ces molécules, produites de manière conjointe par les PLA_2 dont l'activité est stimulée en cas d'inflammation. De plus, la LPC testée dans ces travaux provient de tissu cérébral bovin et contient plusieurs formes de LPC : 60-65 % d'acide palmitique (16:0), 25-27 % d'acide stéarique (18:0) et 6-8 % d'acide oléique (18:1). Ces différentes formes de LPC pourront être testées individuellement afin de savoir plus précisément laquelle ou les lesquelles ont un rôle privilégié. Les études comportementales complèteront ce travail afin de s'assurer du rôle des canaux ASIC3 ou de la part éventuelle des autres canaux ASIC dans la douleur générée par la LPC. Pour cela, l'utilisation des oligonucléotides antisens dirigés contre ASIC3 (dont l'effet est déjà validé), mais aussi contre les canaux ASIC1, sera nécessaire pour permettre un blocage *in vivo* de l'expression des canaux. L'utilisation en parallèle de différentes approches pour inhiber l'activité (inhibiteur pharmacologique) et/ou l'expression (siARN) des canaux ASIC permettra d'éviter une incertitude quant à l'implication d'un canal bien précis. En effet l'APETx2, bloqueur d'ASIC3, aurait, lorsqu'elle est utilisée *in vivo*, des effets non spécifiques et modulerait également l'activité des canaux Na_v 1.8 impliqués dans la douleur (Blanchard et al, 2012).

Enfin, il me semble qu'il est nécessaire de tester des concentrations plus élevées de LPC. En effet, *in vivo* chez l'Homme les concentrations de la LPC sont de l'ordre de 200-300 µM dans le plasma (Fuchs et al, 2012), (Kishimoto et al, 2002). De plus, lors de mécanismes inflammatoires, ces concentrations peuvent être multipliées par six (Secchi et al, 1979). Par exemple, dans une étude où des injections sous-cutanées de LPC sont effectuées chez l'Homme, celle-ci est administrée entre 2 et 8 mM. Cette injection génère une réaction inflammatoire qui se produit dans les minutes suivant l'injection et qui est évaluée par la taille de l'œdème, la présence d'un érythème et par l'augmentation des cellules immunitaires. La LPC est ainsi présente dans les tissus dans des concentrations plus élevées que celles testées ici *in vivo*. Toutefois, il reste délicat d'appréhender la concentration de LPC « biodisponible » *in vivo* puisque ce lipide est lié la plupart du temps à des protéines plasmatiques telles que l'albumine et des lipoprotéines.

DISCUSSION GENERALE

La douleur est un problème majeur de santé publique. Peu de nouveaux médicaments voient le jour et les traitements thérapeutiques actuels sont souvent inefficaces, surtout en ce qui concerne les douleurs chroniques. Face à ce problème médical, il devient capital de comprendre les mécanismes physiologiques et physiopathologiques responsables de ces processus douloureux. De nombreuses conditions douloureuses telles que l'inflammation, les lésions tissulaires, certaines tumeurs, s'accompagnent d'acidose tissulaire. C'est pourquoi les canaux ioniques ASIC, activés par de faibles diminutions du pH extracellulaire, et présents dans le système nerveux qui conduit les informations douloureuses de la périphérie vers les centres supérieurs du cerveau en passant par la moelle épinière, apparaissent comme de nouvelles cibles intéressantes pour le développement de nouveaux traitements analgésiques. Durant mon travail de thèse, je me suis particulièrement intéressée aux rôles et aux régulations des canaux ASIC, et notamment ASIC3.

Les canaux ASIC3 ont pour spécificité d'être très sensibles aux protons. Ils sont activés pour de faibles diminutions du pH autour du pH physiologique (dès pH 7,2). De plus, ces canaux ont la particularité de posséder un courant soutenu qui perdure tant que l'acidose extracellulaire persiste. Ce mécanisme conduisant à une sensibilisation neuronale pourrait être responsable de douleurs chroniques qui perdurent dans le temps. De plus, ce canal est potentialisé par des médiateurs de l'inflammation.

A. ROLE D'ASIC3 DANS LA DOULEUR POST-OPERATOIRE

Les douleurs post-opératoires, sont associées à des acidoses modérées au sein des tissus lésés et sont connues en clinique pour leur chronicité et leur difficulté à être traitées. Nous avons montré que les différentes caractéristiques des canaux ASIC3 en font un acteur important pour la détection des douleurs qui suivent une opération chirurgicale (Deval et al, 2011).

Les canaux ASIC3 sont fortement exprimés dans les neurones sensoriels qui innervent les tissus profonds tels que les muscles ou les articulations (Deval et al, 2011), (Molliver et al, 2005), (Sluka et al, 2003), (Price et al, 2001), (Sluka et al, 2007), (Ikeuchi et al, 2008), (Ikeuchi et al, 2008), (Ikeuchi et al, 2009), (Sluka et al, 2013). De plus, les acidifications tissulaires consécutives aux actes chirurgicaux sont d'autant plus importantes que les incisions se situent au niveau du tissu musculaire (Woo et al, 2004). De manière très intéressante, l'expression des canaux ASIC3 est augmentée dans les nocicepteurs innervant les muscles après une incision (Deval et al, 2011). Enfin, l'inhibition périphérique des canaux ASIC3 au cours de l'opération (toxine APETx2 pour bloquer l'activité des canaux au niveau des terminaisons périphériques ou siARN pour inhiber l'expression des canaux dans les neurones

de DRG) provoque une diminution significative des comportements douloureux post-opératoires.

Cette étude démontre donc qu'ASIC3 est impliqué dans les mécanismes de mise en place de la douleur post-opératoire. Il serait maintenant intéressant d'étudier les effets de l'inhibition « a posteriori » de ces canaux afin de savoir s'ils sont impliqués également dans le maintien de la douleur. Toutefois, d'un point de vue thérapeutique, le traitement durant l'opération est tout à fait envisageable et d'ailleurs déjà pratiqué en ce qui concerne les anesthésiques locaux (Liu et al, 2006), (Scott, 2010).

D'autre part, si le blocage d'ASIC3 permet la réduction des douleurs post-opératoires, il ne suffit pas à abolir totalement ces douleurs, suggérant l'implication d'autres cibles thérapeutiques. ASIC3 n'est en effet pas le seul canal dépolarisant sensible aux protons à être exprimé dans les neurones sensoriels, on trouve également les canaux ASIC1 (Deval et al, 2008), (Deval et al, 2011) et les canaux TRPV1 (Caterina et al, 1997), (Tominaga et al, 1998). Les expériences de délétions des canaux ASIC1 n'ont montré que peu d'effet sur les douleurs musculaires et cutanées, mécaniques ou thermiques (Sluka et al, 2003), (Page et al, 2004). De plus l'inhibition d'ASIC1a par la toxine PcTx1 n'a pas montré d'effet sur les modèles de douleurs aiguës cutanées (Mazzuca et al, 2007) ou inflammatoire (Deval et al, 2008). Toutefois, l'étude récente effectuée au laboratoire, à l'aide de la toxine de mamba noir (Mambalgine) a démontré une implication des canaux contenant ASIC1b dans les douleurs périphériques (Diochot et al, 2012). Il faut ajouter à cela que les effets de la toxine de serpent corail (MitTx) révèlent également une contribution des canaux ASIC1a dans ce type de douleurs (Bohlen et al, 2011). Cependant, si les effets des canaux ASIC1 en périphérie semblent jusqu'ici moins évidents que ceux des canaux ASIC3, on peut penser que les hétéromères ASIC1-ASIC3 puissent être les médiateurs de ces mécanismes douloureux. D'autre part, les canaux TRPV1, bien qu'ils soient moins sensibles aux protons que les canaux ASIC, pourraient être impliqués dans les douleurs post-opératoires. Les valeurs des acidoses dans les tissus lésés (Woo et al, 2004) sont plus en corrélation avec des valeurs d'activation des canaux ASIC, et notamment ASIC3. Malgré tout, cette acidose modérée, en plus de l'environnement inflammatoire et de la température corporelle, pourraient sensibiliser les canaux TRPV1 aux protons (Tominaga et al, 1998). D'autant plus que ces canaux jouent un rôle dans les sensibilisations au chaud et dans l'activité spontanée des fibres afférentes lors d'incision tissulaire (Banik & Brennan, 2009). Cependant, aucune différence de douleur posturale n'a été établie entre les souris invalidées pour TRPV1 et les souris sauvages (Banik & Brennan, 2009). Une étude récente montre même qu'un antagoniste de TRPV1 n'induit aucune réduction des courants induits par l'acide dans les neurones de DRG suite à une incision (Kido et al, 2013). Ces derniers travaux sont en accord avec nos résultats, puisqu'ils démontrent que les ASIC sont particulièrement responsables des courants induits par l'acide après une incision. Mais, ils ne permettent pas de tirer de conclusion quant au rôle spécifique d'ASIC3 dans cette activité post-opératoire des fibres musculaires afférentes car ils n'utilisent qu'un inhibiteur non discriminant des ASIC (l'amiloride).

Ce travail a également permis l'utilisation du nouveau test comportemental de « dynamic weight bearing » qui consiste à mesurer la répartition du poids de l'animal, libre de ses mouvements, sur chacune de ses pattes. De manière inattendue et intéressante, nous avons constaté que le déséquilibre chez les animaux opérés n'était pas toujours dans le sens d'une charge moins élevée sur la patte arrière opérée par rapport à la patte non opérée. Effectivement, de manière générale, les rats lèvent la patte opérée afin de ne pas exercer de pression sur la lésion et réduire ainsi la douleur. Toutefois, certains rats ont adopté un comportement inverse. Ces animaux se reposent et exercent une pression plus forte sur la patte opérée, sur une zone proche de celle lésée. Nous pensons que cela permet un soulagement de la douleur. Ce phénomène pourrait être expliqué par la théorie du « gate control » (Melzack & Wall, 1965). En effet, nous avons tous expérimenté le fait qu'exercer une pression à proximité d'une zone douloureuse permet de soulager la douleur. Par exemple, se frotter le coude après s'être cogné ou bien s'appuyer sur le ventre lors de douleurs abdominales. En fait, de manière intuitive, en s'appuyant sur la patte douloureuse, les animaux mettent en pratique le « gate control ». Ils activent les fibres mécanosensibles. Cette activation permet une stimulation des interneurones inhibiteurs au niveau de la moelle, ce qui réduit l'influx nerveux envoyé aux centres supérieurs. La sensation douloureuse est ainsi réduite (**Figure 19**).

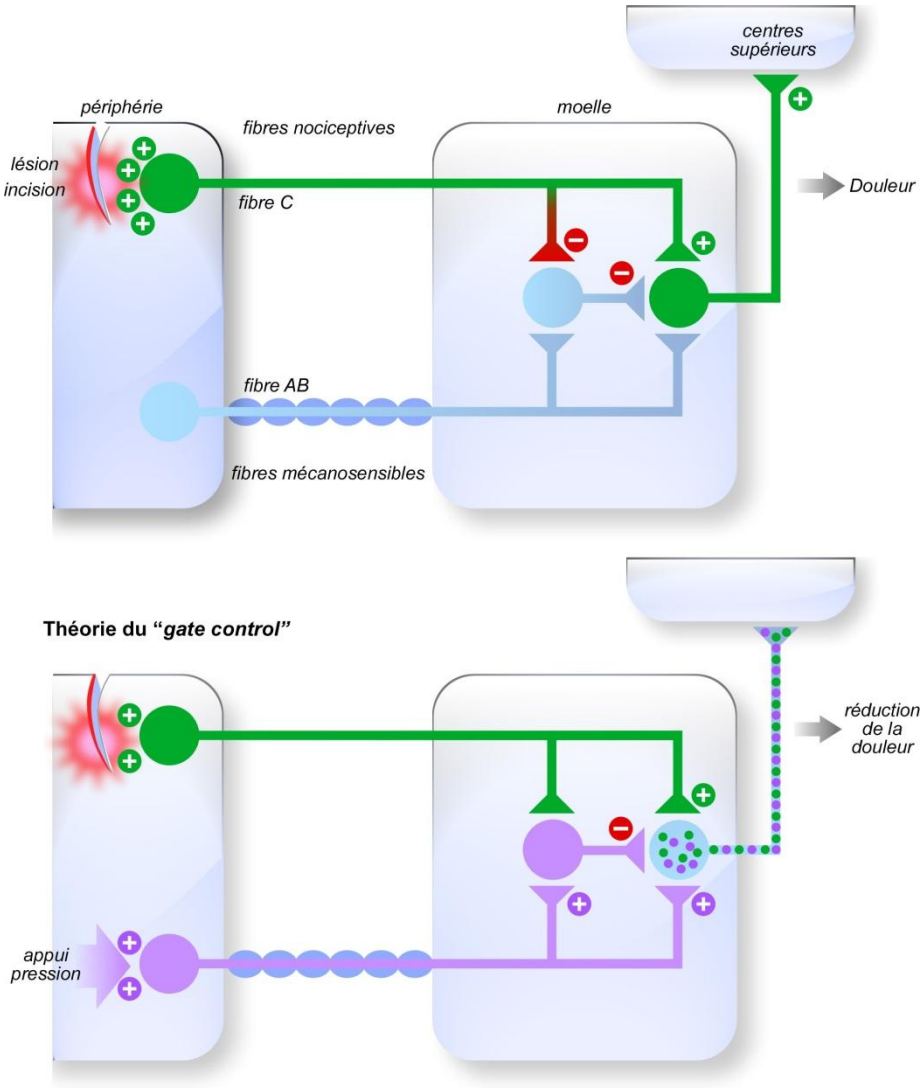


Figure 19 : Schéma de la théorie du « gate control » qui permet une modulation de la perception de la douleur suite à l'activation des fibres mécanosensibles.

La théorie du « gate control » a été élaborée en 1965 par Wall et Melzach. Il s'agit d'un contrôle qui se produit au niveau de la moelle. Lors de l'activation des fibres nociceptives, l'activation des fibres mécanosensibles permet une stimulation des interneurones inhibiteurs au niveau de la moelle. Cela donne lieu à une modulation de la douleur au niveau spinal par réduction des influx nociceptifs envoyés aux centres supérieurs.

Ces altérations de l'équilibre au niveau des pattes arrière (plus ou bien moins de poids sur la patte opérée) dénotent une douleur post-opératoire, puisque les animaux naïfs répartissent équitablement leur poids sur leurs deux pattes arrière. Afin de mettre en évidence ces deux types de déséquilibre, nous avons calculé la valeur absolue de la différence de poids exercé sur chacune des pattes arrière (|ipsilatéral – controlatéral|), comme cela a été fait dans d'autres études (Dube et al, 2005). Ce nouveau test s'est révélé très intéressant pour mesurer des douleurs posturales, plus proches des troubles décrits en clinique. Car, jusque là, la douleur posturale était évaluée de manière moins précise, grâce à un sol quadrillé (comptage du nombre de carreaux sur lesquels reposent les pattes) (Hamalainen et al, 2009), (Kang et al, 2010).

Ces travaux ont permis de mettre en évidence la participation des canaux ASIC3 dans les douleurs post-opératoires dans un modèle rongeur. Ces résultats laissent pressentir ASIC3 comme une cible pour le traitement des douleurs chirurgicales.

B. ACTIVATION D'ASIC3 PAR UN LIPIDE INFLAMMATOIRE

Les douleurs chirurgicales sont souvent chroniques et font vraisemblablement intervenir un processus inflammatoire. Connaissant l'implication d'ASIC3 dans ces processus, je me suis alors intéressée à la régulation de ces canaux par des médiateurs présents dans la « soupe inflammatoire ». D'autre part, si jusqu'ici, seuls les protons étaient connus pour être les activateurs des canaux ASIC, les études récentes sur le GMQ et l'agmatine ont mis en évidence que ce canal pourrait être activé par d'autres ligands endogènes (Li et al, 2010).

Mes études permettent de révéler que la LPC est un activateur jusqu'alors inconnu du canal ASIC3. Ce lipide est issu de l'hydrolyse des phospholipides membranaires par la PLA_2 dont l'activité est augmentée en cas d'inflammation. La LPC est produite en même temps que l'acide arachidonique (AA), qui est un fort potentialisateur du canal ASIC3. Il serait maintenant intéressant de tester les effets synergiques de l'AA et de la LPC.

Parmi les PLA_2, la $sPLA_2X$ (PLA_2 sécrétée, du groupe X) est particulièrement intéressante car elle produit de la LPC et elle est exprimée dans les neurones sensoriels (Sato et al, 2011). De plus, la $sPLA_2X$ est impliquée dans la douleur périphérique (Sato et al, 2011). Les souris invalidées pour cette phospholipase ont une réponse douloureuse réduite de moitié par rapport aux souris sauvages dans un test de douleur induite par l'injection intrapéritonéale d'acide acétique. Il serait ainsi intéressant, par la suite, de tester *in vivo,* les effets de cette $sPLA_2X$ à l'aide des tests douloureux, avant et après inhibition de l'activité ou de l'expression des canaux ASIC3.

D'autre part, nos résultats suggèrent un effet propre de la LPC, indépendant d'une action liée à une déformation membranaire. En effet, la LPC s'insère dans le feuillet externe de la membrane, formant de cette façon des créneaux. Toutefois, parmi les autres molécules

déformatrices de la membrane, aucune n'a modifié l'activité d'ASIC3. Ainsi, il semblerait que l'action de la LPC ne soit pas liée à un effet mécanique de déformation membranaire. La LPC pourrait donc être un « nouvel » activateur endogène direct du canal ASIC3.

Ces données sont intéressantes car de nombreuses conditions physiopathologiques sont à l'origine de libération de protons et de lipides inflammatoires, dont la LPC. Les rôles des canaux ASIC3, activés par les protons et la LPC, pourraient ainsi être fondamentaux dans les processus inflammatoires et les sensibilisations périphériques à l'origine des douleurs chroniques.

Pour étudier les effets endogènes de la LPC, des expériences *in vivo* ont été réalisées. Ces études, effectuées chez des rats, ont montré que l'injection sous-cutanée de LPC en condition d'acidose modérée (pH 7,0), génère une douleur spontanée. Cette douleur semble due à un effet propre de la LPC car un analogue non métabolisable de la LPC (LPC NM) induit également une douleur aiguë chez les animaux. De plus, l'effet proalgique de ce lipide semble impliquer les canaux ASIC3 puisque la douleur est fortement réduite en présence de la toxine APETx2. Toutefois, les études doivent être complétées avec d'autres approches permettant d'inhiber spécifiquement l'expression d'ASIC3. L'utilisation des ARN interférentiels (siARN) pour empêcher la synthèse des protéines ASIC3 chez le rat est à envisager. D'autant que les siARN ont déjà montré leur efficacité chez les rats dans des études précédentes (Deval et al, 2008), (Deval et al, 2011). Des travaux sur les souris invalidées pour ASIC3, souris que nous possédons au laboratoire, peuvent également être envisagées. Néanmoins, il ne faut pas perdre de vue que les comportements douloureux des souris peuvent être différents de ceux des rats. De plus, chez les souris génétiquement modifiées, les sensations douloureuses peuvent être altérées par des mécanismes de compensation. En outre, l'évolution du fond génétique au fil des générations et l'environnement peuvent également modifier les réponses à la douleur. Pour pallier cela, il faudra travailler avec les souris « littermate » ayant été élevées dans les mêmes conditions que les souris invalidées pour le canal d'intérêt. Cela permettrait de s'affranchir des dérives génétiques dues à l'environnement, la nourriture, l'élevage, le stress...

L'activation des canaux ASIC3 par des lipides inflammatoires endogènes comme la LPC peut avoir des conséquences sur la physiopathologie des mécanismes douloureux. En effet, l'activation directe du canal ASIC3 par les protons et certains lipides, permettrait une dépolarisation accrue dès la libération de ces facteurs. Cela pourrait conduire à une excitation rapide de la fibre nerveuse et générer une douleur aiguë ou une douleur qui perdure tant que les lipides sont présents dans le milieu extracellulaire.

D'autres canaux ioniques sont régulés par la LPC ou le LPA. C'est le cas des canaux dépolarisants TRPV1 qui sont modulés par le LPA. Bien que ces effets aient été attribués au départ à une activation de la PKCε dans un modèle de douleur cancéreuse (Pan et al, 2010), une étude récente démontre une activation directe du canal par le LPA, via son domaine C terminal (Nieto-Posadas et al, 2012). Les canaux hyperpolarisants TREK-1 et TRAAK sont

régulés positivement par les LPL (Maingret et al, 2000). Les LPL activent TREK-1 et TRAAK via un effet de déformation membranaire. La LPC active indirectement ces canaux via un possible facteur cytosolique. Une étude plus récente montre que, contrairement aux effets activateurs du LPA intracellulaire (Chemin et al, 2005), le LPA extracellulaire réduit l'activité de TREK-1 (Cohen et al, 2009). Les concentrations physiologiques de LPA (1 µM) inhibent fortement les courants TREK-1 (75 %), même lorsqu'il est appliqué de manière synergique avec des activateurs connus du canal (AA, LPC, chaleur). Cet effet inhibiteur du LPA extracellulaire sur TREK-1 ferait intervenir un récepteur au LPA. Cela active la voie de la protéine Gq-PLC, qui fait intervenir la PKC et inhibe TREK-1. De plus, trois résidus C terminaux du canal TREK-1 ont été identifiés comme impliqués dans ces effets du LPA (Cohen et al, 2009). Les actions diverses des LPL, à la fois sur des canaux dépolarisants et des canaux hyperpolarisants, contribuent certainement à des mécanismes complexes qui résultent en un phénomène de balance entre des effets proalgiques et des effets protecteurs dans les conditions inflammatoires.

Comme nous l'avons évoqué, le LPA possède également des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Il existe cinq RCPG pour le LPA, nommés LPA_{1-5} (Ishii et al, 2009), (Noguchi et al, 2009). Dans les années 2000, le récepteur LPA_1 a été impliqué dans la transmission de la douleur (Renback et al, 2000). Depuis, de nombreux travaux se succèdent liant ce récepteur à différentes douleurs périphériques (Inoue et al, 2004), (Inoue et al, 2008a), (Inoue et al, 2008b), (Xie et al, 2008), (Ueda, 2008), (Inoue et al, 2008c), (Ma et al, 2009), (Pan et al, 2010), (Nagai et al, 2010), (Ueda, 2011). Les récepteurs LPA_1 sont associés à l'initiation de la douleur neuropathique, à la « sur-régulation » de molécules clés sous-jacentes à l'hyperalgie, à la démyélinisation responsable de l'allodynie mais également à la réorganisation synaptique dans les voies de la douleur. Les récepteurs LPA_3, quant à eux, ont un rôle dans la production de la LPA, tout comme la microglie qui est capable d'amplifier cette synthèse. En ce qui concerne la LPC, aucun récepteur spécifique n'est connu à l'heure actuelle. L'interaction de la LPC avec un RCPG avait été mise en évidence en 2001 (Kabarowski et al, 2001), mais a ensuite été démentie. Cette absence de récepteur pour la LPC renforce l'intérêt d'ASIC3 comme cible endogène.

C. PROPRIETE ORIGINALE DU CANAL ASIC3 HUMAIN

L'ensemble de mes travaux de thèse montre donc qu'ASIC3 est un canal impliqué dans les mécanismes périphériques des douleurs post-opératoires et inflammatoires. Toutefois, peu d'études ont jusqu'alors été consacrées à l'isoforme humaine de la protéine ASIC3, il est ainsi difficile de savoir quels sont les rôles physiologiques ou physiopathologiques de ce canal chez l'Homme.

Nous avons donc étudié l'expression et les propriétés du canal ASIC3 humain, et nous avons montré que chez l'Homme, la protéine ASIC3 (hASIC3) existe sous trois isoformes

différentes : hASIC3a, hASIC3b et hASIC3c, variant par leur extrémité C-terminale. Contrairement aux rongeurs, où les ARNm d'ASIC3 sont spécifiques du système nerveux périphérique, chez l'Homme, les transcrits sont exprimés dans les tissus nerveux périphériques (DRG) et centraux (moelle épinière et cerveau). L'isoforme hASIC3a est la plus représentée et nous avons découvert que les canaux ASIC3 humains (hASIC3a, hASIC3b et hASIC3c) possèdent une propriété particulière. Le canal est en effet capable de répondre non seulement à l'acidification mais également à l'alcalinisation du milieu extracellulaire, ce qui n'avait jamais été mis en évidence pour des canaux ASIC.

Cette particularité est caractérisée par deux modes de fonctionnement distincts : un mode transitoire dépolarisant « classique » en réponse à l'acidification extracellulaire, et un courant soutenu dépolarisant en réponse à l'alcalinisation extracellulaire. De manière intéressante, quand cette sensibilité à l'alcalinisation n'est pas présente dans une cellule en condition basale, elle peut être induite. Nous avons ainsi montré que l'acide arachidonique, un important lipide présent dans les conditions inflammatoires, est capable d'induire cette sensibilité à l'alcalinisation. Cette étude met en évidence une sensibilité directe du canal ASIC3 humain à l'alcalose, contrairement à d'autres canaux ioniques comme les TRPV1 ou les TRPA1. En effet, ces canaux sont également régulés par l'alcalinisation, mais de manière indirecte, via la hausse du pH intracellulaire secondaire à une alcalinisation extracellulaire. Le fait que cette propriété originale puisse être induite par des médiateurs extracellulaires est particulièrement intéressant, puisque le canal pourrait ainsi acquérir et/ou moduler ses propriétés selon l'environnement.

Certaines pathologies génèrent une alcalinisation extracellulaire. C'est le cas des épanchements qui se produisent lors de fistules pancréatiques, qui provoquent des douleurs abdominales, et des phénomènes d'hyperventilation. Les canaux ASIC3 pourraient être impliqués dans ces douleurs et les modifications sensorielles liées à l'alcalinisation mais ils pourraient également avoir pour rôle de détecter les variations fines de pH autour des valeurs physiologiques et ce, dans le sens d'une acidification et d'une alcalinisation.

Toutefois, à ce stade, il est difficile de préjuger si cette propriété est portée par un certain type de neurones ou bien, si elle dépend de certaines conditions environnementales et biochimiques ou encore, s'il s'agit d'une adaptation dynamique des canaux aux différentes conditions de pH extracellulaire. Il est, bien entendu, encore plus difficile de tirer des conclusions sur les conséquences d'une telle propriété au niveau physiologique ou physiopathologique à l'échelle de l'organisme humain. Pour répondre à ces questions, encore une fois, le développement de molécules inhibitrices spécifiques des ASIC, et particulièrement d'ASIC3, utilisables chez l'Homme, serait nécessaire. Elles seraient de bons outils pour étudier le rôle de ce canal dans la physiologie humaine.

PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS GENERALES

De nombreuses conditions qui génèrent des douleurs, comme l'inflammation, l'ischémie, les lésions tissulaires, réduisent le pH extracellulaire. Ces observations ont conduit à l'hypothèse qu'il devait exister des récepteurs sur les neurones nociceptifs dont l'activation serait dépendante du pH extracellulaire. Les canaux ASIC, activés par les protons et présents à tous les niveaux du système nerveux, sont ainsi apparus comme des candidats intéressants. D'autant plus que certains ASIC, sont exprimés dans les zones du système nerveux importantes pour la modulation de la douleur (nocicepteurs, corne dorsale de la moelle épinière). Les études pharmacologiques et comportementales sur les animaux invalidés pour le gène codant ces différents canaux ont documenté les rôles de ceux-ci dans plusieurs types de douleurs telles que les douleurs acides, inflammatoires, post-opératoires et ischémiques.

Nous avons montré dans nos études que les canaux ASIC3 sont impliqués dans les douleurs consécutives à une intervention chirurgicale. De plus, les canaux ASIC3 sont activés par un lipide et pourraient ainsi avoir un rôle dans les conditions d'inflammations. Enfin, de manière très intéressante, les canaux ASIC3 humains expriment des caractéristiques particulières et originales qui leur confèrent une sensibilité à l'alcalinisation en plus de celle à l'acidose. Bien que les conséquences physiologiques d'une telle propriété restent à établir, il semble qu'elle puisse conférer des rôles « nouveaux » aux canaux ASIC3 importants dans la physiologie ou physiopathologie humaine.

Maintenant, il serait souhaitable de déterminer dans quelle mesure nos connaissances sur les ASIC sont transférables à l'Homme. Pour cela, une voie de recherche pourrait être l'étude d'associations éventuelles entre des pathologies humaines et des altérations génétiques de ces canaux. Bien qu'à ce jour, aucune pathologie héréditaire n'ait impliquée des mutations des canaux ASIC, certaines associations génétiques suggèrent un rôle de ces canaux dans la sclérose en plaques (Bernardinelli et al, 2007), l'autisme (Stone et al, 2007), un syndrome sévère de retard mental (Girirajan et al, 2007) ou encore l'anxiété (Hettema et al, 2008). Une autre voie d'étude est le développement d'inhibiteurs spécifiques des ASIC, utilisables chez l'Homme, pour déterminer leurs effets sur l'organisme dans son intégralité et sa complexité. A ce propos, l'utilisation de l'amiloride, inhibant les canaux ASIC, a permis de démasquer un rôle des canaux ASIC1 dans la migraine (Holland et al, 2012) et dans la progression de la sclérose en plaques (Arun et al, 2013).

Pour conclure, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliquant les ASIC permettrait de clarifier comment l'inhibition ou la potentialisation de ces canaux affectent la physiologie, la physiopathologie ainsi que le comportement. Ces connaissances aideraient au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les ASIC ou leurs modulateurs.

BIBLIOGRAPHIE

Ahn DK, Lee SY, Han SR, Ju JS, Yang GY, Lee MK, Youn DH, Bae YC (2009) Intratrigeminal ganglionic injection of LPA causes neuropathic pain-like behavior and demyelination in rats. *Pain* **146**(1-2)**:** 114-120

Akopian AN, Chen CC, Ding Y, Cesare P, Wood JN (2000) A new member of the acid-sensing ion channel family. *Neuroreport* **11**(10)**:** 2217-2222

Akopian AN, Souslova V, England S, Okuse K, Ogata N, Ure J, Smith A, Kerr BJ, McMahon SB, Boyce S, Hill R, Stanfa LC, Dickenson AH, Wood JN (1999) The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. *Nat Neurosci* **2**(6)**:** 541-548

Allard M, Rousselot P, Lombard MC, Theodosis DT (1999) Evidence for neuropeptide FF (FLFQRFamide) in rat dorsal root ganglia. *Peptides* **20**(3)**:** 327-333

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**(11)**:** 2368-2376

Alvarez de la Rosa D, Zhang P, Shao D, White F, Canessa CM (2002) Functional implications of the localization and activity of acid-sensitive channels in rat peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(4)**:** 2326-2331

Amaya F (2007) [Contribution of CB1 receptor in the DRG for nociception and its use for pain treatment]. *Masui* **56 Suppl:** S78-82

Amaya F, Oh-hashi K, Naruse Y, Iijima N, Ueda M, Shimosato G, Tominaga M, Tanaka Y, Tanaka M (2003) Local inflammation increases vanilloid receptor 1 expression within distinct subgroups of DRG neurons. *Brain Res* **963**(1-2)**:** 190-196

Amaya F, Samad TA, Barrett L, Broom DC, Woolf CJ (2009) Periganglionic inflammation elicits a distally radiating pain hypersensitivity by promoting COX-2 induction in the dorsal root ganglion. *Pain* **142**(1-2)**:** 59-67

Arias RL, Sung ML, Vasylyev D, Zhang MY, Albinson K, Kubek K, Kagan N, Beyer C, Lin Q, Dwyer JM, Zaleska MM, Bowlby MR, Dunlop J, Monaghan M (2008) Amiloride is neuroprotective in an MPTP model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **31**(3)**:** 334-341

Arun T, Tomassini V, Sbardella E, de Ruiter MB, Matthews L, Leite MI, Gelineau-Morel R, Cavey A, Vergo S, Craner M, Fugger L, Rovira A, Jenkinson M, Palace J (2013) Targeting ASIC1 in primary progressive multiple sclerosis: evidence of neuroprotection with amiloride. *Brain* **136**(Pt 1)**:** 106-115

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**(1)**:** 133-141

Ates O, Karakus N, Sezer S, Bozkurt N (2013) Genetic association of 5-HT1A and 5-HT1B gene polymorphisms with migraine in a Turkish population. *J Neurol Sci* **326**(1-2)**:** 64-67

Autret A, Valade D, Debiais S (2012) Placebo and other psychological interactions in headache treatment. *J Headache Pain* **13**(3)**:** 191-198

Babenko VV, Graven-Nielsen T, Svensson P, Drewes AM, Jensen TS, Arendt-Nielsen L (1999) Experimental human muscle pain induced by intramuscular injections of bradykinin, serotonin, and substance P. *Eur J Pain* **3**(2)**:** 93-102

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**(37)**:** 28519-28525

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**(1)**:** 51-57

Ballou LR, Botting RM, Goorha S, Zhang J, Vane JR (2000) Nociception in cyclooxygenase isozyme-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(18)**:** 10272-10276

Banik RK, Brennan TJ (2009) Trpv1 mediates spontaneous firing and heat sensitization of cutaneous primary afferents after plantar incision. *Pain* **141**(1-2)**:** 41-51

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**(38)**:** 35361-35367

Baron A, Voilley N, Lazdunski M, Lingueglia E (2008) Acid sensing ion channels in dorsal spinal cord neurons. *J Neurosci* **28**(6)**:** 1498-1508

Baron A, Waldmann R, Lazdunski M (2002) ASIC-like, proton-activated currents in rat hippocampal neurons. *J Physiol* **539**(Pt 2)**:** 485-494

Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* **139**(2)**:** 267-284

Basran GS, Page CP, Paul W, Morley J (1984) Platelet-activating factor: a possible mediator of the dual response to allergen? *Clin Allergy* **14**(1)**:** 75-79

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**(46)**:** 28819-28822

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**(36)**:** 33782-33787

Bean BP, Friel DD (1990) ATP-activated channels in excitable cells. *Ion Channels* **2:** 169-203

Beecher HK (1955) The powerful placebo. *J Am Med Assoc* **159**(17)**:** 1602-1606

Benedetti F (1996) The opposite effects of the opiate antagonist naloxone and the cholecystokinin antagonist proglumide on placebo analgesia. *Pain* **64**(3)**:** 535-543

Benson CJ, Eckert SP, McCleskey EW (1999) Acid-evoked currents in cardiac sensory neurons: A possible mediator of myocardial ischemic sensation. *Circ Res* **84**(8)**:** 921-928

Bernardinelli L, Murgia SB, Bitti PP, Foco L, Ferrai R, Musu L, Prokopenko I, Pastorino R, Saddi V, Ticca A, Piras ML, Cox DR, Berzuini C (2007) Association between the ACCN1 gene and multiple sclerosis in Central East Sardinia. *PLoS One* **2**(5)**:** e480

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**(4)**:** 739-749

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**(7)**:** 2167-2177

Bleehen T, Keele CA (1977) Observations on the algogenic actions of adenosine compounds on the human blister base preparation. *Pain* **3**(4)**:** 367-377

Bohlen CJ, Chesler AT, Sharif-Naeini R, Medzihradszky 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**(7373)**:** 410-414

Bonnefont J, Courade JP, Alloui A, Eschalier A (2003) [Antinociceptive mechanism of action of paracetamol]. *Drugs* **63 Spec No 2:** 1-4

Bonnefont J, Daulhac L, Etienne M, Chapuy E, Mallet C, Ouchchane L, Deval C, Courade JP, Ferrara M, Eschalier A, Clottes E (2007) Acetaminophen recruits spinal p42/p44 MAPKs and GH/IGF-1 receptors to produce analgesia via the serotonergic system. *Mol Pharmacol* **71**(2)**:** 407-415

Bourinet E, Alloui A, Monteil A, Barrere C, Couette B, Poirot O, Pages A, McRory J, Snutch TP, Eschalier A, Nargeot J (2005) Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *EMBO J* **24**(2)**:** 315-324

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**(10)**:** 7130-7135

Brake AJ, Wagenbach MJ, Julius D (1994) New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* **371**(6497)**:** 519-523

Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF (1996) Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain* **64**(3)**:** 493-501

Brockway LM, Benos DJ, Keyser KT, Kraft TW (2005) Blockade of amiloride-sensitive sodium channels alters multiple components of the mammalian electroretinogram. *Vis Neurosci* **22**(2)**:** 143-151

Brockway LM, Zhou ZH, Bubien JK, Jovov B, Benos DJ, Keyser KT (2002) Rabbit retinal neurons and glia express a variety of ENaC/DEG subunits. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**(1)**:** C126-134

Brodie BB, Axelrod J (1948) The estimation of acetanilide and its metabolic products, aniline, N-acetyl p-aminophenol and p-amino-phenol, free and total conjugated, in biological fluids and tissues. *J Pharmacol Exp Ther* **94**(1)**:** 22-28

Burnes LA, Kolker SJ, Danielson JF, Walder RY, Sluka KA (2008) Enhanced muscle fatigue occurs in male but not female ASIC3-/- mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**(4)**:** R1347-1355

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**(48)**:** 13251-13260

Camilleri M (2006) Management of patients with chronic abdominal pain in clinical practice. *Neurogastroenterol Motil* **18**(7)**:** 499-506

Camilleri M, Lasch K, Zhou W (2012) Irritable bowel syndrome: methods, mechanisms, and pathophysiology. The confluence of increased permeability, inflammation, and pain in irritable bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **303**(7)**:** G775-785

Canessa CM, Horisberger JD, Rossier BC (1993) Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. *Nature* **361**(6411)**:** 467-470

Canning BJ (2006) Reflex regulation of airway smooth muscle tone. *J Appl Physiol* **101**(3)**:** 971-985

Carpenter KJ, Nandi M, Dickenson AH (2001) Peripheral administration of low pH solutions causes activation and sensitisation of convergent dorsal horn neurones in the anaesthetised rat. *Neurosci Lett* **298**(3)**:** 179-182

Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* **288**(5464)**:** 306-313

Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* **398**(6726)**:** 436-441

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**(6653)**:** 816-824

Catterall WA, Striessnig J, Snutch TP, Perez-Reyes E (2003) International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacol Rev* **55**(4)**:** 579-581

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**(21)**:** 13926-13931

Chemin J, Patel A, Duprat F, Zanzouri M, Lazdunski M, Honore E (2005) Lysophosphatidic acid-operated K+ channels. *J Biol Chem* **280**(6)**:** 4415-4421

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**(6548)**:** 428-431

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**(17)**:** 10240-10245

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 U S A* **99**(13)**:** 8992-8997

Chen ML, Cheng C, Lv QS, Guo ZQ, Gao Y, Gao SF, Li X, Niu SQ, Shi SX, Shen AG (2008) Altered gene expression of NIDD in dorsal root ganglia and spinal cord of rats with neuropathic or inflammatory pain. *J Mol Histol* **39**(2)**:** 125-133

Chen WH, Hsieh CL, Huang CP, Lin TJ, Tzen JT, Ho TY, Lin YW (2011) Acid-sensing ion channel 3 mediates peripheral anti-hyperalgesia effects of acupuncture in mice inflammatory pain. *J Biomed Sci* **18:** 82

Chen X, Grunder S (2007) Permeating protons contribute to tachyphylaxis of the acid-sensing ion channel (ASIC) 1a. *J Physiol* **579**(Pt 3)**:** 657-670

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**(1)**:** 71-79

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**(3)**:** 267-276

Chen X, Levine JD (1999) NOS inhibitor antagonism of PGE2-induced mechanical sensitization of cutaneous C-fiber nociceptors in the rat. *J Neurophysiol* **81**(3)**:** 963-966

Chen Y, Boettger MK, Reif A, Schmitt A, Uceyler N, Sommer C (2010) Nitric oxide synthase modulates CFA-induced thermal hyperalgesia through cytokine regulation in mice. *Mol Pain* **6:** 13

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**(40)**:** 8678-8689

Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D (2001) Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature* **411**(6840)**:** 957-962

Chvetzoff G, Tannock IF (2003) Placebo effects in oncology. *J Natl Cancer Inst* **95**(1)**:** 19-29

Cockayne DA, Hamilton SG, Zhu QM, Dunn PM, Zhong Y, Novakovic S, Malmberg AB, Cain G, Berson A, Kassotakis L, Hedley L, Lachnit WG, Burnstock G, McMahon SB, Ford AP (2000) Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *Nature* **407**(6807)**:** 1011-1015

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**(3)**:** 382-389

Collin E, Poulain P, Gauvain-Piquard A, Petit G, Pichard-Leandri E (1993) Is disease progression the major factor in morphine 'tolerance' in cancer pain treatment? *Pain* **55**(3)**:** 319-326

Cox JJ, Reimann F, Nicholas AK, Thornton G, Roberts E, Springell K, Karbani G, Jafri H, Mannan J, Raashid Y, Al-Gazali L, Hamamy H, Valente EM, Gorman S, Williams R, McHale DP, Wood JN, Gribble FM, Woods CG (2006) An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* **444**(7121)**:** 894-898

D'Mello R, Dickenson AH (2008) Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth* **101**(1)**:** 8-16

Danziger N, Fournier E, Bouhassira D, Michaud D, De Broucker T, Santarcangelo E, Carli G, Chertock L, Willer JC (1998) Different strategies of modulation can be operative during hypnotic analgesia: a neurophysiological study. *Pain* **75**(1)**:** 85-92

De Alba J, Clayton NM, Collins SD, Colthup P, Chessell I, Knowles RG (2006) GW274150, a novel and highly selective inhibitor of the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS), shows analgesic effects in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *Pain* **120**(1-2)**:** 170-181

de Weille J, Bassilana F (2001) Dependence of the acid-sensitive ion channel, ASIC1a, on extracellular Ca(2+) ions. *Brain Res* **900**(2)**:** 277-281

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**(3)**:** 257-260

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**(32)**:** 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**(5)**:** 662-671

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**(3)**:** 549-558

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**(16)**:** 6059-6066

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**(22)**:** 3047-3055

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**(19)**:** 19531-19539

Dhaka A, Uzzell V, Dubin AE, Mathur J, Petrus M, Bandell M, Patapoutian A (2009) TRPV1 is activated by both acidic and basic pH. *J Neurosci* **29**(1)**:** 153-158

Dhond RP, Kettner N, Napadow V (2007) Neuroimaging acupuncture effects in the human brain. *J Altern Complement Med* **13**(6)**:** 603-616

Dib-Hajj SD, Cummins TR, Black JA, Waxman SG (2010) Sodium channels in normal and pathological pain. *Annu Rev Neurosci* **33:** 325-347

Dib-Hajj SD, Estacion M, Jarecki BW, Tyrrell L, Fischer TZ, Lawden M, Cummins TR, Waxman SG (2008) Paroxysmal extreme pain disorder M1627K mutation in human Nav1.7 renders DRG neurons hyperexcitable. *Mol Pain* **4:** 37

Dickenson AH (1995) Spinal cord pharmacology of pain. *Br J Anaesth* **75**(2)**:** 193-200

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**(7)**:** 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**(7421)**:** 552-555

Docherty RJ, Farmer CE (2009) The pharmacology of voltage-gated sodium channels in sensory neurones. *Handb Exp Pharmacol*(194)**:** 519-561

Dogrul A, Gardell LR, Ossipov MH, Tulunay FC, Lai J, Porreca F (2003) Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers. *Pain* **105**(1-2)**:** 159-168

Dogrul A, Gulmez SE, Deveci MS, Gul H, Ossipov MH, Porreca F, Tulunay FC (2007) The local antinociceptive actions of nonsteroidal antiinflammatory drugs in the mouse radiant heat tail-flick test. *Anesth Analg* **104**(4)**:** 927-935

Drenth JP, Waxman SG (2007) Mutations in sodium-channel gene SCN9A cause a spectrum of human genetic pain disorders. *J Clin Invest* **117**(12)**:** 3603-3609

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**(6310)**:** 588-593

Drobnik W, Liebisch G, Audebert FX, Frohlich D, Gluck T, Vogel P, Rothe G, Schmitz G (2003) Plasma ceramide and lysophosphatidylcholine inversely correlate with mortality in sepsis patients. *J Lipid Res* **44**(4)**:** 754-761

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**(41)**:** 11139-11148

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**(1-2)**:** 88-96

Eisenbarth H, Rukwied R, Petersen M, Schmelz M (2004) Sensitization to bradykinin B1 and B2 receptor activation in UV-B irradiated human skin. *Pain* **110**(1-2)**:** 197-204

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**(33)**:** 25116-25121

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**(21)**:** 5800-5809

Ettaiche M, Deval E, Pagnotta S, Lazdunski M, Lingueglia E (2009) Acid-sensing ion channel 3 in retinal function and survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**(5)**:** 2417-2426

Ettaiche M, Guy N, Hofman P, Lazdunski M, Waldmann R (2004) Acid-sensing ion channel 2 is important for retinal function and protects against light-induced retinal degeneration. *J Neurosci* **24**(5)**:** 1005-1012

Everill B, Kocsis JD (1999) Reduction in potassium currents in identified cutaneous afferent dorsal root ganglion neurons after axotomy. *J Neurophysiol* **82**(2)**:** 700-708

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**(5)**:** 973-981

Flatters SJ (2008) Characterization of a model of persistent postoperative pain evoked by skin/muscle incision and retraction (SMIR). *Pain* **135**(1-2)**:** 119-130

Fort J (1999) Celecoxib, a COX-2--specific inhibitor: the clinical data. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* **28**(3 Suppl)**:** 13-18

Fox A, Bevan S (2005) Therapeutic potential of cannabinoid receptor agonists as analgesic agents. *Expert Opin Investig Drugs* **14**(6)**:** 695-703

Fox A, Kesingland A, Gentry C, McNair K, Patel S, Urban L, James I (2001) The role of central and peripheral Cannabinoid1 receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain. *Pain* **92**(1-2)**:** 91-100

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**(9)**:** 1285-1290

Friese MA, Craner MJ, Etzensperger R, Vergo S, Wemmie JA, Welsh MJ, Vincent A, Fugger L (2007) Acid-sensing ion channel-1 contributes to axonal degeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Nat Med* **13**(12)**:** 1483-1489

Fromy B, Lingueglia E, Sigaudo-Roussel D, Saumet JL, Lazdunski M (2012) Asic3 is a neuronal mechanosensor for pressure-induced vasodilation that protects against pressure ulcers. *Nat Med*

Fuchs B, Bondzio A, Wagner U, Schiller J (2009) Phospholipid compositions of sera and synovial fluids from dog, human and horse: a comparison by 31P-NMR and MALDI-TOF MS. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* **93**(4)**:** 410-422

Fuchs B, Muller K, Paasch U, Schiller J (2012) Lysophospholipids: potential markers of diseases and infertility? *Mini Rev Med Chem* **12**(1)**:** 74-86

Fuchs B, Schiller J (2009) Lysophospholipids: their generation, physiological role and detection. Are they important disease markers? *Mini Rev Med Chem* **9**(3)**:** 368-378

Fujita F, Uchida K, Moriyama T, Shima A, Shibasaki K, Inada H, Sokabe T, Tominaga M (2008) Intracellular alkalization causes pain sensation through activation of TRPA1 in mice. *J Clin Invest* **118**(12)**:** 4049-4057

Fujita R, Kiguchi N, Ueda H (2007) LPA-mediated demyelination in ex vivo culture of dorsal root. *Neurochem Int* **50**(2)**:** 351-355

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**(1)**:** 150-155

Furedi R, Bolcskei K, Szolcsanyi J, Petho G (2010) Comparison of the peripheral mediator background of heat injury- and plantar incision-induced drop of the noxious heat threshold in the rat. *Life Sci* **86**(7-8)**:** 244-250

Gannon KP, Vanlandingham LG, Jernigan NL, Grifoni SC, Hamilton G, Drummond HA (2008) Impaired pressure-induced constriction in mouse middle cerebral arteries of ASIC2 knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**(4)**:** H1793-1803

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* **100**(2)**:** 421-426

Garcia-Anoveros J, Samad TA, Zuvela-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**(8)**:** 2678-2686

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**(2)**:** 793-802

Girirajan S, Williams S, Garbern J, Nowak N, Hatchwell E, Elsea S (2007) 17p11.2p12 triplication and del(17)q11.2q12 in a severely affected child with dup(17)p11.2p12 syndrome. *Clin Genet* **72**(1)**:** 47-58

Gitterman DP, Wilson J, Randall AD (2005) Functional properties and pharmacological inhibition of ASIC channels in the human SJ-RH30 skeletal muscle cell line. *J Physiol* **562**(Pt 3)**:** 759-769

Gizurarson S, Shao Y, Miljanovic A, Ramunddal T, Boren J, Bergfeldt L, Omerovic E (2012) Electrophysiological effects of lysophosphatidylcholine on HL-1 cardiomyocytes assessed with a microelectrode array system. *Cell Physiol Biochem* **30**(2)**:** 477-488

Gold MS, Zhang L, Wrigley DL, Traub RJ (2002) Prostaglandin E(2) modulates TTX-R I(Na) in rat colonic sensory neurons. *J Neurophysiol* **88**(3)**:** 1512-1522

Goldman B (1993) Use and abuse of opioid analgesics in chronic pain. *Can Fam Physician* **39:** 571-576

Goldman N, Chen M, Fujita T, Xu Q, Peng W, Liu W, Jensen TK, Pei Y, Wang F, Han X, Chen JF, Schnermann J, Takano T, Bekar L, Tieu K, Nedergaard M (2010) Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture. *Nat Neurosci* **13**(7)**:** 883-888

Gonzales EB, Kawate T, Gouaux E (2009) Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors. *Nature* **460**(7255)**:** 599-604

Greenwald RA, Deluca RF, Raskin JB (1979) Pancreatic-pleural fistula: demonstration by endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) and successful treatment with radiation therapy. *Dig Dis Sci* **24**(3)**:** 240-244

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**(6)**:** 883-899

Groth M, Helbig T, Grau V, Kummer W, Haberberger RV (2006) Spinal afferent neurons projecting to the rat lung and pleura express acid sensitive channels. *Respir Res* **7:** 96

Grunder S, Geissler HS, Bassler EL, Ruppersberg JP (2000) A new member of acid-sensing ion channels from pituitary gland. *Neuroreport* **11**(8)**:** 1607-1611

Gu Q, Lee LY (2006) Characterization of acid signaling in rat vagal pulmonary sensory neurons. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **291**(1)**:** L58-65

Guerrero AV, Quang P, Dekker N, Jordan RC, Schmidt BL (2008) Peripheral cannabinoids attenuate carcinoma-induced nociception in mice. *Neurosci Lett* **433**(2)**:** 77-81

Hamalainen MM, Subieta A, Arpey C, Brennan TJ (2009) Differential effect of capsaicin treatment on pain-related behaviors after plantar incision. *J Pain* **10**(6)**:** 637-645

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):** 1238-1246

Hamza M, Wang XM, Adam A, Brahim JS, Rowan JS, Carmona GN, Dionne RA (2010) Kinin B1 receptors contributes to acute pain following minor surgery in humans. *Mol Pain* **6:** 12

Hargreaves KM, Troullos ES, Dionne RA, Schmidt EA, Schafer SC, Joris JL (1988) Bradykinin is increased during acute and chronic inflammation: therapeutic implications. *Clin Pharmacol Ther* **44**(6)**:** 613-621

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**(3)**:** 279-286

Heidland A, Fazeli G, Klassen A, Sebekova K, Hennemann H, Bahner U, Di Iorio B (2013) Neuromuscular electrostimulation techniques: historical aspects and current possibilities in treatment of pain and muscle waisting. *Clin Nephrol* **79 Suppl 1:** S12-23

Hettema JM, An SS, Neale MC, van den Oord EJ, Kendler KS, Chen X (2008) Lack of association between the amiloride-sensitive cation channel 2 (ACCN2) gene and anxiety spectrum disorders. *Psychiatr Genet* **18**(2)**:** 73-79

Hildebrand MS, de Silva MG, Klockars T, Rose E, Price M, Smith RJ, McGuirt WT, Christopoulos H, Petit C, Dahl HH (2004) Characterisation of DRASIC in the mouse inner ear. *Hear Res* **190**(1-2)**:** 149-160

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**(36)**:** 31405-31412

Hoheisel U, Reinohl J, Unger T, Mense S (2004) Acidic pH and capsaicin activate mechanosensitive group IV muscle receptors in the rat. *Pain* **110**(1-2)**:** 149-157

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**(4)**:** 559-563

Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ (2006) Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol* **66**(3)**:** 232-245

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**(5)**:** 863-875

Huque T, Cowart BJ, Dankulich-Nagrudny L, Pribitkin EA, Bayley DL, Spielman AI, Feldman RS, Mackler SA, Brand JG (2009) Sour ageusia in two individuals implicates ion channels of the ASIC and PKD families in human sour taste perception at the anterior tongue. *PLoS One* **4**(10)**:** e7347

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**(3)**:** 662-669

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**(3)**:** 336-342

Immke DC, McCleskey EW (2001a) ASIC3: a lactic acid sensor for cardiac pain. *ScientificWorldJournal* **1:** 510-512

Immke DC, McCleskey EW (2001b) Lactate enhances the acid-sensing Na+ channel on ischemia-sensing neurons. *Nat Neurosci* **4**(9)**:** 869-870

Immke DC, McCleskey EW (2003) Protons open acid-sensing ion channels by catalyzing relief of Ca2+ blockade. *Neuron* **37**(1)**:** 75-84

Inoue M, Ma L, Aoki J, Chun J, Ueda H (2008a) Autotaxin, a synthetic enzyme of lysophosphatidic acid (LPA), mediates the induction of nerve-injured neuropathic pain. *Mol Pain* **4:** 6

Inoue M, Ma L, Aoki J, Ueda H (2008b) Simultaneous stimulation of spinal NK1 and NMDA receptors produces LPC which undergoes ATX-mediated conversion to LPA, an initiator of neuropathic pain. *J Neurochem* **107**(6)**:** 1556-1565

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**(7)**:** 712-718

Inoue M, Xie W, Matsushita Y, Chun J, Aoki J, Ueda H (2008c) Lysophosphatidylcholine induces neuropathic pain through an action of autotaxin to generate lysophosphatidic acid. *Neuroscience* **152**(2)**:** 296-298

Ishii S, Noguchi K, Yanagida K (2009) Non-Edg family lysophosphatidic acid (LPA) receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **89**(3-4)**:** 57-65

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

Jahr H, van Driel M, van Osch GJ, Weinans H, van Leeuwen JP (2005) Identification of acid-sensing ion channels in bone. *Biochem Biophys Res Commun* **337**(1)**:** 349-354

Jarvis MF, Burgard EC, McGaraughty S, Honore P, Lynch K, Brennan TJ, Subieta A, Van Biesen T, Cartmell J, Bianchi B, Niforatos W, Kage K, Yu H, Mikusa J, Wismer CT, Zhu CZ, Chu K, Lee CH, Stewart AO, Polakowski J, Cox BF, Kowaluk E, Williams M, Sullivan J, Faltynek C (2002) A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X3 and P2X2/3 receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(26)**:** 17179-17184

Jarvis MF, Honore P, Shieh CC, Chapman M, Joshi S, Zhang XF, Kort M, Carroll W, Marron B, Atkinson R, Thomas J, Liu D, Krambis M, Liu Y, McGaraughty S, Chu K, Roeloffs R, Zhong C, Mikusa JP, Hernandez G, Gauvin D, Wade C, Zhu C, Pai M, Scanio M, Shi L, Drizin I, Gregg R, Matulenko M, Hakeem A, Gross M, Johnson M, Marsh K, Wagoner PK, Sullivan JP, Faltynek CR, Krafte DS (2007) A-803467, a potent and selective Nav1.8 sodium channel blocker, attenuates neuropathic and inflammatory pain in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(20)**:** 8520-8525

Jasti J, Furukawa H, Gonzales EB, Gouaux E (2007) Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 A resolution and low pH. *Nature* **449**(7160)**:** 316-323

Jones NG, Slater R, Cadiou H, McNaughton P, McMahon SB (2004) Acid-induced pain and its modulation in humans. *J Neurosci* **24**(48)**:** 10974-10979

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**(47)**:** 10981-10989

Joshi SK, Mikusa JP, Hernandez G, Baker S, Shieh CC, Neelands T, Zhang XF, Niforatos W, Kage K, Han P, Krafte D, Faltynek C, Sullivan JP, Jarvis MF, Honore P (2006) Involvement of the TTX-resistant sodium channel Nav 1.8 in inflammatory and neuropathic, but not post-operative, pain states. *Pain* **123**(1-2)**:** 75-82

Jospin M, Allard B (2004) An amiloride-sensitive H+-gated Na+ channel in Caenorhabditis elegans body wall muscle cells. *J Physiol* **559**(Pt 3)**:** 715-720

Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413**(6852)**:** 203-210

Kabarowski JH, Zhu K, Le LQ, Witte ON, Xu Y (2001) Lysophosphatidylcholine as a ligand for the immunoregulatory receptor G2A. *Science* **293**(5530)**:** 702-705

Kaiser H (2008) [From the plant to chemistry--the early history of "rheumatic medication"]. *Z Rheumatol* **67**(3)**:** 252-262

Kang S, Brennan TJ (2009) Chemosensitivity and mechanosensitivity of nociceptors from incised rat hindpaw skin. *Anesthesiology* **111**(1)**:** 155-164

Kang S, Wu C, Banik RK, Brennan TJ (2010) Effect of capsaicin treatment on nociceptors in rat glabrous skin one day after plantar incision. *Pain* **148**(1)**:** 128-140

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**(4)**:** 950-960

Kawano T, Zoga V, McCallum JB, Wu HE, Gemes G, Liang MY, Abram S, Kwok WM, Hogan QH, Sarantopoulos CD (2009) ATP-sensitive potassium currents in rat primary afferent neurons: biophysical, pharmacological properties, and alterations by painful nerve injury. *Neuroscience* **162**(2)**:** 431-443

Khakh BS, North RA (2006) P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* **442**(7102)**:** 527-532

Khan AA, Raja SN, Manning DC, Campbell JN, Meyer RA (1992) The effects of bradykinin and sequence-related analogs on the response properties of cutaneous nociceptors in monkeys. *Somatosens Mot Res* **9**(2)**:** 97-106

Kidd BL, Urban LA (2001) Mechanisms of inflammatory pain. *Br J Anaesth* **87**(1)**:** 3-11

Kido K, Gautam M, Benson CJ, Gu H, Brennan TJ (2013) Effect of Deep Tissue Incision on pH Responses of Afferent Fibers and Dorsal Root Ganglia Innervating Muscle. *Anesthesiology*

Kiernan BD, Dane JR, Phillips LH, Price DD (1995) Hypnotic analgesia reduces R-III nociceptive reflex: further evidence concerning the multifactorial nature of hypnotic analgesia. *Pain* **60**(1)**:** 39-47

Kim BM, Lee SH, Shim WS, Oh U (2004) Histamine-induced Ca(2+) influx via the PLA(2)/lipoxygenase/TRPV1 pathway in rat sensory neurons. *Neurosci Lett* **361**(1-3)**:** 159-162

Kim DS, Choi JO, Rim HD, Cho HJ (2002) Downregulation of voltage-gated potassium channel alpha gene expression in dorsal root ganglia following chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. *Brain Res Mol Brain Res* **105**(1-2)**:** 146-152

Kim TH, Kim HI, Song JH (2006) Effects of nordihydroguaiaretic acid on Na+ currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* **1072**(1)**:** 62-71

Kim TJ, Freml L, Park SS, Brennan TJ (2007) Lactate concentrations in incisions indicate ischemic-like conditions may contribute to postoperative pain. *J Pain* **8**(1)**:** 59-66

Kishimoto T, Soda Y, Matsuyama Y, Mizuno K (2002) An enzymatic assay for lysophosphatidylcholine concentration in human serum and plasma. *Clin Biochem* **35**(5)**:** 411-416

Kolesnikov YA, Wilson RS, Pasternak GW (2003) The synergistic analgesic interactions between hydrocodone and ibuprofen. *Anesth Analg* **97**(6)**:** 1721-1723

Kolker SJ, Walder RY, Usachev Y, Hillman J, Boyle DL, Firestein GS, Sluka KA (2010) Acid-sensing ion channel 3 expressed in type B synoviocytes and chondrocytes modulates hyaluronan expression and release. *Ann Rheum Dis* **69**(5)**:** 903-909

Kollarik M, Undem BJ (2002) Mechanisms of acid-induced activation of airway afferent nerve fibres in guinea-pig. *J Physiol* **543**(Pt 2)**:** 591-600

Krishtal OA, Pidoplichko VI (1980) A receptor for protons in the nerve cell membrane. *Neuroscience* **5**(12)**:** 2325-2327

Krishtal OA, Pidoplichko VI (1981) A "receptor" for protons in small neurons of trigeminal ganglia: possible role in nociception. *Neurosci Lett* **24**(3)**:** 243-246

Kudo I, Murakami M (2002) Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69:** 3-58

Lai J, Gold MS, Kim CS, Bian D, Ossipov MH, Hunter JC, Porreca F (2002) Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, NaV1.8. *Pain* **95**(1-2)**:** 143-152

Langlade A, Jussiau C, Lamonerie L, Marret E, Bonnet F (2002) Hypnosis increases heat detection and heat pain thresholds in healthy volunteers. *Reg Anesth Pain Med* **27**(1)**:** 43-46

Lawson K, Dunne MJ (2001) Peripheral channelopathies as targets for potassium channel openers. *Expert Opin Investig Drugs* **10**(7)**:** 1345-1359

Levine JD, Gordon NC, Fields HL (1978) The mechanism of placebo analgesia. *Lancet* **2**(8091)**:** 654-657

Levy D, Zochodne DW (2000) Increased mRNA expression of the B1 and B2 bradykinin receptors and antinociceptive effects of their antagonists in an animal model of neuropathic pain. *Pain* **86**(3)**:** 265-271

Li T, Yang Y, Canessa CM (2009) Interaction of the aromatics Tyr-72/Trp-288 in the interface of the extracellular and transmembrane domains is essential for proton gating of acid-sensing ion channels. *J Biol Chem* **284**(7)**:** 4689-4694

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

Lingueglia E (2007) Acid-sensing ion channels in sensory perception. *J Biol Chem* **282**(24)**:** 17325-17329

Lingueglia E, Champigny G, Lazdunski M, Barbry P (1995) Cloning of the amiloride-sensitive FMRFamide peptide-gated sodium channel. *Nature* **378**(6558)**:** 730-733

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**(47)**:** 29778-29783

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**(5)**:** 1138-1152

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**(1)**:** 95-99

Liu SS, Richman JM, Thirlby RC, Wu CL (2006) Efficacy of continuous wound catheters delivering local anesthetic for postoperative analgesia: a quantitative and qualitative systematic review of randomized controlled trials. *J Am Coll Surg* **203**(6)**:** 914-932

Lolignier S, Amsalem M, Maingret F, Padilla F, Gabriac M, Chapuy E, Eschalier A, Delmas P, Busserolles J (2011) Nav1.9 channel contributes to mechanical and heat pain hypersensitivity induced by subacute and chronic inflammation. *PLoS One* **6**(8)**:** e23083

Longhurst JC, Kaufman MP, Ordway GA, Musch TI (1984) Effects of bradykinin and capsaicin on endings of afferent fibers from abdominal visceral organs. *Am J Physiol* **247**(3 Pt 2)**:** R552-559

Lopshire JC, Nicol GD (1997) Activation and recovery of the PGE2-mediated sensitization of the capsaicin response in rat sensory neurons. *J Neurophysiol* **78**(6)**:** 3154-3164

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**(16)**:** 6081-6092

Loyd DR, Weiss G, Henry MA, Hargreaves KM (2011) Serotonin increases the functional activity of capsaicin-sensitive rat trigeminal nociceptors via peripheral serotonin receptors. *Pain* **152**(10)**:** 2267-2276

Lucas R, Warner TD, Vojnovic I, Mitchell JA (2005) Cellular mechanisms of acetaminophen: role of cyclo-oxygenase. *FASEB J* **19**(6)**:** 635-637

Ma L, Nagai J, Ueda H (2010) Microglial activation mediates de novo lysophosphatidic acid production in a model of neuropathic pain. *J Neurochem* **115**(3)**:** 643-653

Ma L, Uchida H, Nagai J, Inoue M, Chun J, Aoki J, Ueda H (2009) Lysophosphatidic acid-3 receptor-mediated feed-forward production of lysophosphatidic acid: an initiator of nerve injury-induced neuropathic pain. *Mol Pain* **5:** 64

Macefield G, Burke D (1991) Paraesthesiae and tetany induced by voluntary hyperventilation. Increased excitability of human cutaneous and motor axons. *Brain* **114 (Pt 1B):** 527-540

Maillefert JF, Gueguen A, Monreal M, Nguyen M, Berdah L, Lequesne M, Mazieres B, Vignon E, Dougados M (2003) Sex differences in hip osteoarthritis: results of a longitudinal study in 508 patients. *Ann Rheum Dis* **62**(10)**:** 931-934

Maingret F, Coste B, Padilla F, Clerc N, Crest M, Korogod SM, Delmas P (2008) Inflammatory mediators increase Nav1.9 current and excitability in nociceptors through a coincident detection mechanism. *J Gen Physiol* **131**(3)**:** 211-225

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**(14)**:** 10128-10133

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**(1)**:** 190-200

Malmberg AB, Yaksh TL (1995) Effect of continuous intrathecal infusion of omega-conopeptides, N-type calcium-channel blockers, on behavior and antinociception in the formalin and hot-plate tests in rats. *Pain* **60**(1)**:** 83-90

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**(24)**:** 10662-10670

Mamet J, Lazdunski M, Voilley N (2003) How nerve growth factor drives physiological and inflammatory expressions of acid-sensing ion channel 3 in sensory neurons. *J Biol Chem* **278**(49)**:** 48907-48913

Mantyh PW, Clohisy DR, Koltzenburg M, Hunt SP (2002) Molecular mechanisms of cancer pain. *Nat Rev Cancer* **2**(3)**:** 201-209

Maquet P, Faymonville ME, Degueldre C, Delfiore G, Franck G, Luxen A, Lamy M (1999) Functional neuroanatomy of hypnotic state. *Biol Psychiatry* **45**(3)**:** 327-333

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**(8)**:** 943-945

McConaghy JR, Oza RS (2013) Outpatient diagnosis of acute chest pain in adults. *Am Fam Physician* **87**(3)**:** 177-182

McLaughlin CR, Abood ME (1993) Developmental expression of cannabinoid receptor mRNA. *Brain Res Dev Brain Res* **76**(1)**:** 75-78

Melzack R, Wall PD (1965) Pain mechanisms: a new theory. *Science* **150**(3699)**:** 971-979

Mense S (2008) Muscle pain: mechanisms and clinical significance. *Dtsch Arztebl Int* **105**(12)**:** 214-219

Michael GJ, Priestley JV (1999) Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy. *J Neurosci* **19**(5)**:** 1844-1854

Michaelis M, Habler HJ, Jaenig W (1996) Silent afferents: a separate class of primary afferents? *Clin Exp Pharmacol Physiol* **23**(2)**:** 99-105

Miranda HF, Lemus I, Pinardi G (2003) Effect of the inhibition of serotonin biosynthesis on the antinociception induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Brain Res Bull* **61**(4)**:** 417-425

Miranda HF, Lopez J, Sierralta F, Correa A, Pinardi G (2001) NSAID antinociception measured in a chemical and a thermal assay in mice. *Pain Res Manag* **6**(4)**:** 190-196

Mitra R, Jones S (2012) Adjuvant analgesics in cancer pain: a review. *Am J Hosp Palliat Care* **29**(1)**:** 70-79

Miyamoto T, Dubin AE, Petrus MJ, Patapoutian A (2009) TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. *PLoS One* **4**(10)**:** e7596

Mogil JS (2009) Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci* **10**(4)**:** 283-294

Mogil JS, Breese NM, Witty MF, Ritchie J, Rainville ML, Ase A, Abbadi N, Stucky CL, Seguela P (2005) Transgenic expression of a dominant-negative ASIC3 subunit leads to increased sensitivity to mechanical and inflammatory stimuli. *J Neurosci* **25**(43)**:** 9893-9901

Moinard C, Cynober L, de Bandt JP (2005) Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin Nutr* **24**(2)**:** 184-197

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

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

Nagai J, Uchida H, Matsushita Y, Yano R, Ueda M, Niwa M, Aoki J, Chun J, Ueda H (2010) Autotaxin and lysophosphatidic acid1 receptor-mediated demyelination of dorsal root fibers by sciatic nerve injury and intrathecal lysophosphatidylcholine. *Mol Pain* **6:** 78

Napadow V, Kettner N, Liu J, Li M, Kwong KK, Vangel M, Makris N, Audette J, Hui KK (2007) Hypothalamus and amygdala response to acupuncture stimuli in Carpal Tunnel Syndrome. *Pain* **130**(3)**:** 254-266

Nassar MA, Levato A, Stirling LC, Wood JN (2005) Neuropathic pain develops normally in mice lacking both Na(v)1.7 and Na(v)1.8. *Mol Pain* **1:** 24

Nassar MA, Stirling LC, Forlani G, Baker MD, Matthews EA, Dickenson AH, Wood JN (2004) Nociceptor-specific gene deletion reveals a major role for Nav1.7 (PN1) in acute and inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(34)**:** 12706-12711

Nicolson TA, Bevan S, Richards CD (2002) Characterisation of the calcium responses to histamine in capsaicin-sensitive and capsaicin-insensitive sensory neurones. *Neuroscience* **110**(2)**:** 329-338

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**(1)**:** 78-85

Niiyama Y, Kawamata T, Yamamoto J, Omote K, Namiki A (2007) Bone cancer increases transient receptor potential vanilloid subfamily 1 expression within distinct subpopulations of dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* **148**(2)**:** 560-572

Noel 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**(3)**:** 331-346

Noguchi K, Herr D, Mutoh T, Chun J (2009) Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors. *Curr Opin Pharmacol* **9**(1)**:** 15-23

North RA (2003) The P2X3 subunit: a molecular target in pain therapeutics. *Curr Opin Investig Drugs* **4**(7)**:** 833-840

Okamoto A, Sugi E, Koizumi Y, Yanagida F, Udaka S (1997) Polyamine content of ordinary foodstuffs and various fermented foods. *Biosci Biotechnol Biochem* **61**(9)**:** 1582-1584

Olesen AE, Andresen T, Staahl C, Drewes AM (2012) Human experimental pain models for assessing the therapeutic efficacy of analgesic drugs. *Pharmacol Rev* **64**(3)**:** 722-779

Omote K, Kawamata T, Nakayama Y, Yamamoto H, Kawamata M, Namiki A (2002) Effects of a novel selective agonist for prostaglandin receptor subtype EP4 on hyperalgesia and inflammation in monoarthritic model. *Anesthesiology* **97**(1)**:** 170-176

Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SM, Lamerdin JE, Mohrenweiser HW, Bulman DE, Ferrari M, Haan J, Lindhout D, van Ommen GJ, Hofker MH, Ferrari MD, Frants RR (1996) Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca2+ channel gene CACNL1A4. *Cell* **87**(3)**:** 543-552

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*

Ouellet M, Percival MD (2001) Mechanism of acetaminophen inhibition of cyclooxygenase isoforms. *Arch Biochem Biophys* **387**(2)**:** 273-280

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**(6)**:** 1739-1747

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**(10)**:** 1408-1415

Palazzos E, de Novellis V, Marabese I, Rossi F, Maione S (2006) Metabotropic glutamate and cannabinoid receptor crosstalk in periaqueductal grey pain processing. *Curr Neuropharmacol* **4**(3)**:** 225-231

Pan HL, Stahl GL, Rendig SV, Carretero OA, Longhurst JC (1994) Endogenous BK stimulates ischemically sensitive abdominal visceral C fiber afferents through kinin B2 receptors. *Am J Physiol* **267**(6 Pt 2)**:** H2398-2406

Pan HL, Zhang YQ, Zhao ZQ (2010) Involvement of lysophosphatidic acid in bone cancer pain by potentiation of TRPV1 via PKCepsilon pathway in dorsal root ganglion neurons. *Mol Pain* **6:** 85

Park SY, Choi JY, Kim RU, Lee YS, Cho HJ, Kim DS (2003) Downregulation of voltage-gated potassium channel alpha gene expression by axotomy and neurotrophins in rat dorsal root ganglia. *Mol Cells* **16**(2)**:** 256-259

Pasternak GW (2012) Preclinical pharmacology and opioid combinations. *Pain Med* **13 Suppl 1:** S4-11

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**(15)**:** 4283-4290

Patel AJ, Lazdunski M, Honore E (2001) Lipid and mechano-gated 2P domain K(+) channels. *Curr Opin Cell Biol* **13**(4)**:** 422-428

Patocka J, Kuehn GD (2000) Natural polyamines and their biological consequence in mammals. *Acta Medica (Hradec Kralove)* **43**(4)**:** 119-124

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**(4)**:** 383-394

Paukert M, Chen X, Polleichtner G, Schindelin H, Grunder S (2008) Candidate amino acids involved in H+ gating of acid-sensing ion channel 1a. *J Biol Chem* **283**(1)**:** 572-581

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**(12)**:** 5141-5151

Peng BG, Ahmad S, Chen S, Chen P, Price MP, Lin X (2004) Acid-sensing ion channel 2 contributes a major component to acid-evoked excitatory responses in spiral ganglion neurons and plays a role in noise susceptibility of mice. *J Neurosci* **24**(45)**:** 10167-10175

Pertovaara A (2006) Noradrenergic pain modulation. *Prog Neurobiol* **80**(2)**:** 53-83

Petho G, Reeh PW (2012) Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. *Physiol Rev* **92**(4)**:** 1699-1775

Pietrobon D (2007) Familial hemiplegic migraine. *Neurotherapeutics* **4**(2)**:** 274-284

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**(1)**:** 31-40

Pinto M, Castro AR, Tshudy F, Wilson SP, Lima D, Tavares I (2008) Opioids modulate pain facilitation from the dorsal reticular nucleus. *Mol Cell Neurosci* **39**(4)**:** 508-518

Pogatzki-Zahn EM, Zahn PK, Brennan TJ (2007) Postoperative pain--clinical implications of basic research. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* **21**(1)**:** 3-13

Pospisilova E, Palecek J (2006) Post-operative pain behavior in rats is reduced after single high-concentration capsaicin application. *Pain* **125**(3)**:** 233-243

Potvin S, Grignon S, Marchand S (2009) Human evidence of a supra-spinal modulating role of dopamine on pain perception. *Synapse* **63**(5)**:** 390-402

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**(6807)**:** 1007-1011

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**(6)**:** 1071-1083

Price MP, Snyder PM, Welsh MJ (1996) Cloning and expression of a novel human brain Na+ channel. *J Biol Chem* **271**(14)**:** 7879-7882

Priest BT, Murphy BA, Lindia JA, Diaz C, Abbadie C, Ritter AM, Liberator P, Iyer LM, Kash SF, Kohler MG, Kaczorowski GJ, MacIntyre DE, Martin WJ (2005) Contribution of the tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel NaV1.9 to sensory transmission and nociceptive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(26)**:** 9382-9387

Qadri YJ, Berdiev BK, Song Y, Lippton HL, Fuller CM, Benos DJ (2009) Psalmotoxin-1 docking to human acid-sensing ion channel-1. *J Biol Chem* **284**(26)**:** 17625-17633

Rackham A, Ford-Hutchinson AW (1983) Inflammation and pain sensitivity: effects of leukotrienes D4, B4 and prostaglandin E1 in the rat paw. *Prostaglandins* **25**(2)**:** 193-203

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**(1)**:** 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**(2)**:** 350-354

Rocha-Gonzalez HI, Herrejon-Abreu EB, Lopez-Santillan FJ, Garcia-Lopez BE, Murbartian J, Granados-Soto V (2009) Acid increases inflammatory pain in rats: effect of local peripheral ASICs inhibitors. *Eur J Pharmacol* **603**(1-3)**:** 56-61

Roza C, Laird JM, Souslova V, Wood JN, Cervero F (2003) The tetrodotoxin-resistant Na+ channel Nav1.8 is essential for the expression of spontaneous activity in damaged sensory axons of mice. *J Physiol* **550**(Pt 3)**:** 921-926

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**(Pt 2)**:** 659-669

Ryborg AK, Deleuran B, Sogaard H, Kragballe K (2000) Intracutaneous injection of lysophosphatidylcholine induces skin inflammation and accumulation of leukocytes. *Acta Derm Venereol* **80**(4)**:** 242-246

Ryborg AK, Gron B, Kragballe K (1995) Increased lysophosphatidylcholine content in lesional psoriatic skin. *Br J Dermatol* **133**(3)**:** 398-402

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**(46)**:** 31851-31859

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**(Pt 2)**:** 339-354

Samways DS, Harkins AB, Egan TM (2009) Native and recombinant ASIC1a receptors conduct negligible Ca2+ entry. *Cell Calcium* **45**(4)**:** 319-325

Sarantopoulos CD, McCallum JB, Rigaud M, Fuchs A, Kwok WM, Hogan QH (2007) Opposing effects of spinal nerve ligation on calcium-activated potassium currents in axotomized and adjacent mammalian primary afferent neurons. *Brain Res* **1132**(1)**:** 84-99

Sastre M, Galea E, Feinstein D, Reis DJ, Regunathan S (1998) Metabolism of agmatine in macrophages: modulation by lipopolysaccharide and inhibitory cytokines. *Biochem J* **330 (Pt 3):** 1405-1409

Sato H, Isogai Y, Masuda S, Taketomi Y, Miki Y, Kamei D, Hara S, Kobayashi T, Ishikawa Y, Ishii T, Ikeda K, Taguchi R, Ishimoto Y, Suzuki N, Yokota Y, Hanasaki K, Suzuki-Yamamoto T, Yamamoto K, Murakami M (2011) Physiological roles of group X-secreted phospholipase A2 in reproduction, gastrointestinal phospholipid digestion, and neuronal function. *J Biol Chem* **286**(13)**:** 11632-11648

Sawynok J, Esser MJ, Reid AR (2001) Antidepressants as analgesics: an overview of central and peripheral mechanisms of action. *J Psychiatry Neurosci* **26**(1)**:** 21-29

Scholz A (2002) Mechanisms of (local) anaesthetics on voltage-gated sodium and other ion channels. *Br J Anaesth* **89**(1)**:** 52-61

Schwartz L, Guais A, Pooya M, Abolhassani M (2009) Is inflammation a consequence of extracellular hyperosmolarity? *J Inflamm (Lond)* **6:** 21

Scott DJ, Stohler CS, Egnatuk CM, Wang H, Koeppe RA, Zubieta JK (2008) Placebo and nocebo effects are defined by opposite opioid and dopaminergic responses. *Arch Gen Psychiatry* **65**(2)**:** 220-231

Scott NB (2010) Wound infiltration for surgery. *Anaesthesia* **65 Suppl 1:** 67-75

Secchi AG, Fregona I, D'Ermo F (1979) Lysophosphatidyl choline in the aqueous humour during ocular inflammation. *Br J Ophthalmol* **63**(11)**:** 768-770

Sevastou I, Kaffe E, Mouratis MA, Aidinis V (2013) Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders: the PLA(2)/LPC and ATX/LPA axes. *Biochim Biophys Acta* **1831**(1)**:** 42-60

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**(41)**:** 27899-27907

Shin J, Cho H, Hwang SW, Jung J, Shin CY, Lee SY, Kim SH, Lee MG, Choi YH, Kim J, Haber NA, Reichling DB, Khasar S, Levine JD, Oh U (2002) Bradykinin-12-lipoxygenase-VR1 signaling pathway for inflammatory hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(15)**:** 10150-10155

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**(3)**:** 229-239

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**(1-2)**:** 102-112

Sluka KA, Rasmussen LA, Edgar MM, O'Donnell JM, Walder RY, Kolker SJ, Boyle DL, Firestein GS (2013) Acid-sensing ion channel 3 deficiency increases inflammation but decreases pain behavior in murine arthritis. *Arthritis Rheum* **65**(5)**:** 1194-1202

Sluka KA, Winter OC, Wemmie JA (2009) Acid-sensing ion channels: A new target for pain and CNS diseases. *Curr Opin Drug Discov Devel* **12**(5)**:** 693-704

Smith ES, Cadiou H, McNaughton PA (2007) Arachidonic acid potentiates acid-sensing ion channels in rat sensory neurons by a direct action. *Neuroscience* **145**(2)**:** 686-698

Smith JB, Willis AL (1971) Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nat New Biol* **231**(25)**:** 235-237

Souslova V, Cesare P, Ding Y, Akopian AN, Stanfa L, Suzuki R, Carpenter K, Dickenson A, Boyce S, Hill R, Nebenuis-Oosthuizen D, Smith AJ, Kidd EJ, Wood JN (2000) Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X3 receptors. *Nature* **407**(6807)**:** 1015-1017

Staats PS, Yearwood T, Charapata SG, Presley RW, Wallace MS, Byas-Smith M, Fisher R, Bryce DA, Mangieri EA, Luther RR, Mayo M, McGuire D, Ellis D (2004) Intrathecal ziconotide in the treatment of refractory pain in patients with cancer or AIDS: a randomized controlled trial. *JAMA* **291**(1)**:** 63-70

Staruschenko A, Dorofeeva NA, Bolshakov KV, Stockand JD (2007) Subunit-dependent cadmium and nickel inhibition of acid-sensing ion channels. *Dev Neurobiol* **67**(1)**:** 97-107

Steen KH, Issberner U, Reeh PW (1995a) Pain due to experimental acidosis in human skin: evidence for non-adapting nociceptor excitation. *Neurosci Lett* **199**(1)**:** 29-32

Steen KH, Reeh PW, Kreysel HW (1995b) Topical acetylsalicylic, salicylic acid and indomethacin suppress pain from experimental tissue acidosis in human skin. *Pain* **62**(3)**:** 339-347

Steen KH, Steen AE, Reeh PW (1995c) A dominant role of acid pH in inflammatory excitation and sensitization of nociceptors in rat skin, in vitro. *J Neurosci* **15**(5 Pt 2)**:** 3982-3989

Stein AT, Ufret-Vincenty CA, Hua L, Santana LF, Gordon SE (2006) Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane. *J Gen Physiol* **128**(5)**:** 509-522

Stein C, Zollner C (2009) Opioids and sensory nerves. *Handb Exp Pharmacol*(194)**:** 495-518

Stoelb BL, Molton IR, Jensen MP, Patterson DR (2009) The Efficacy of Hypnotic Analgesia in Adults: A Review of the Literature. *Contemp Hypn* **26**(1)**:** 24-39

Stone JL, Merriman B, Cantor RM, Geschwind DH, Nelson SF (2007) High density SNP association study of a major autism linkage region on chromosome 17. *Hum Mol Genet* **16**(6)**:** 704-715

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**(10)**:** 2617-2627

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**(2)**:** 711-716

Syntichaki P, Tavernarakis N (2004) Genetic models of mechanotransduction: the nematode Caenorhabditis elegans. *Physiol Rev* **84**(4)**:** 1097-1153

Szolcsanyi J (1987) Selective responsiveness of polymodal nociceptors of the rabbit ear to capsaicin, bradykinin and ultra-violet irradiation. *J Physiol* **388:** 9-23

Takeda M, Tanimoto T, Ikeda M, Kadoi J, Nasu M, Matsumoto S (2004) Opioidergic modulation of excitability of rat trigeminal root ganglion neuron projections to the superficial layer of cervical dorsal horn. *Neuroscience* **125**(4)**:** 995-1008

Takeda M, Tanimoto T, Ikeda M, Nasu M, Kadoi J, Yoshida S, Matsumoto S (2006) Enhanced excitability of rat trigeminal root ganglion neurons via decrease in A-type potassium currents following temporomandibular joint inflammation. *Neuroscience* **138**(2)**:** 621-630

Takeda M, Tsuboi Y, Kitagawa J, Nakagawa K, Iwata K, Matsumoto S (2011) Potassium channels as a potential therapeutic target for trigeminal neuropathic and inflammatory pain. *Mol Pain* **7:** 5

Tan ZY, Lu Y, Whiteis CA, Benson CJ, Chapleau MW, Abboud FM (2007) Acid-sensing ion channels contribute to transduction of extracellular acidosis in rat carotid body glomus cells. *Circ Res* **101**(10)**:** 1009-1019

Tegeder I, Meier S, Burian M, Schmidt H, Geisslinger G, Lotsch J (2003) Peripheral opioid analgesia in experimental human pain models. *Brain* **126**(Pt 5)**:** 1092-1102

Tjolsen A, Lund A, Hole K (1991) Antinociceptive effect of paracetamol in rats is partly dependent on spinal serotonergic systems. *Eur J Pharmacol* **193**(2)**:** 193-201

Todorovic SM, Pathirathna S, Meyenburg A, Jevtovic-Todorovic V (2004) Mechanical and thermal anti-nociception in rats after systemic administration of verapamil. *Neurosci Lett* **360**(1-2)**:** 57-60

Tokumura A, Kume T, Taira S, Yasuda K, Kanzaki H (2009) Altered activity of lysophospholipase D, which produces bioactive lysophosphatidic acid and choline, in serum from women with pathological pregnancy. *Mol Hum Reprod* **15**(5)**:** 301-310

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**(3)**:** 531-543

Treede RD, Meyer RA, Raja SN, Campbell JN (1992) Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. *Prog Neurobiol* **38**(4)**:** 397-421

Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H (2008) Opioid pharmacology. *Pain Physician* **11**(2 Suppl)**:** S133-153

Tyagi A, Agarwal C, Dwyer-Nield LD, Singh RP, Malkinson AM, Agarwal R (2012) Silibinin modulates TNF-alpha and IFN-gamma mediated signaling to regulate COX2 and iNOS expression in tumorigenic mouse lung epithelial LM2 cells. *Mol Carcinog* **51**(10)**:** 832-842

Ueda H (2008) Peripheral mechanisms of neuropathic pain - involvement of lysophosphatidic acid receptor-mediated demyelination. *Mol Pain* **4:** 11

Ueda H (2011) Lysophosphatidic acid as the initiator of neuropathic pain. *Biol Pharm Bull* **34**(8)**:** 1154-1158

Ugawa S, Inagaki A, Yamamura H, Ueda T, Ishida Y, Kajita K, Shimizu H, Shimada S (2006) Acid-sensing ion channel-1b in the stereocilia of mammalian cochlear hair cells. *Neuroreport* **17**(12)**:** 1235-1239

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**(8)**:** 1185-1190

Ugawa S, Yamamoto T, Ueda T, Ishida Y, Inagaki A, Nishigaki M, Shimada S (2003) Amiloride-insensitive currents of the acid-sensing ion channel-2a (ASIC2a)/ASIC2b heteromeric sour-taste receptor channel. *J Neurosci* **23**(9)**:** 3616-3622

Undem BJ, Weinreich D (1993) Electrophysiological properties and chemosensitivity of guinea pig nodose ganglion neurons in vitro. *J Auton Nerv Syst* **44**(1)**:** 17-33

Vakili C, Ruiz-Ortiz F, Burke JF (1970) Chemical and osmolar changes of interstitial fluid in acute inflammatory states. *Surg Forum* **21:** 227-228

Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, Buell G (1994) A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* **371**(6497)**:** 516-519

Van de Ven TJ, John Hsia HL (2012) Causes and prevention of chronic postsurgical pain. *Curr Opin Crit Care* **18**(4)**:** 366-371

Vane JR (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* **231**(25)**:** 232-235

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**(5)**:** 804-811

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**(20)**:** 8026-8033

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**(10)**:** 2348-2356

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**(3)**:** 210-218

Waldmann R, Bassilana F, de Weille J, Champigny G, Heurteaux C, Lazdunski M (1997a) Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na+ channel specific for sensory neurons. *J Biol Chem* **272**(34)**:** 20975-20978

Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Heurteaux C, Lazdunski M (1997b) A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* **386**(6621)**:** 173-177

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**(18)**:** 10433-10436

Wallace JL, McKnight W, Reuter BK, Vergnolle N (2000) NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology* **119**(3)**:** 706-714

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**(8)**:** 3221-3233

Wang SM, Kain ZN, White PF (2008) Acupuncture analgesia: II. Clinical considerations. *Anesth Analg* **106**(2)**:** 611-621, table of contents

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**(5)**:** 2497-2505

Wang W, Ye SD, Zhou KQ, Wu LM, Huang YN (2012) High doses of salicylate and aspirin are inhibitory on acid-sensing ion channels and protective against acidosis-induced neuronal injury in the rat cortical neuron. *J Neurosci Res* **90**(1)**:** 267-277

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**(2)**:** 631-641

Wang Y, Hackel D, Peng F, Rittner HL (2013) Long-term antinociception by electroacupuncture is mediated via peripheral opioid receptors in free-moving rats with inflammatory hyperalgesia. *Eur J Pain*

Warner TD, Vojnovic I, Giuliano F, Jimenez R, Bishop-Bailey D, Mitchell JA (2004) Cyclooxygenases 1, 2, and 3 and the production of prostaglandin I2: investigating the activities of acetaminophen and cyclooxygenase-2-selective inhibitors in rat tissues. *J Pharmacol Exp Ther* **310**(2)**:** 642-647

Weiss N, De Waard M (2006) [Voltage-dependent calcium channels at the heart of pain perception]. *Med Sci (Paris)* **22**(4)**:** 396-404

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**(13)**:** 5496-5502

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**(3)**:** 463-477

Wemmie JA, Coryell MW, Askwith CC, Lamani E, Leonard AS, Sigmund CD, Welsh MJ (2004) Overexpression of acid-sensing ion channel 1a in transgenic mice increases acquired fear-related behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(10)**:** 3621-3626

Wemmie JA, Taugher RJ, Kreple CJ (2013) Acid-sensing ion channels in pain and disease. *Nat Rev Neurosci* **14**(7)**:** 461-471

Wilson SG, Mogil JS (2001) c. *Behav Brain Res* **125**(1-2)**:** 65-73

Wong HK, Bauer PO, Kurosawa M, Goswami A, Washizu C, Machida Y, Tosaki A, Yamada M, Knopfel T, Nakamura T, Nukina N (2008) Blocking acid-sensing ion channel 1 alleviates Huntington's disease pathology via an ubiquitin-proteasome system-dependent mechanism. *Hum Mol Genet* **17**(20)**:** 3223-3235

Woo YC, Park SS, Subieta AR, Brennan TJ (2004) Changes in tissue pH and temperature after incision indicate acidosis may contribute to postoperative pain. *Anesthesiology* **101**(2)**:** 468-475

Wood JN, Boorman JP, Okuse K, Baker MD (2004) Voltage-gated sodium channels and pain pathways. *J Neurobiol* **61**(1)**:** 55-71

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**(42)**:** 43716-43724

Wu WL, Wang CH, Huang EY, Chen CC (2009) Asic3(-/-) female mice with hearing deficit affects social development of pups. *PLoS One* **4**(8)**:** e6508

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**(3)**:** 245-253

Xie W, Matsumoto M, Chun J, Ueda H (2008) Involvement of LPA1 receptor signaling in the reorganization of spinal input through Abeta-fibers in mice with partial sciatic nerve injury. *Mol Pain* **4:** 46

Xu J, Brennan TJ (2009) Comparison of skin incision vs. skin plus deep tissue incision on ongoing pain and spontaneous activity in dorsal horn neurons. *Pain* **144**(3)**:** 329-339

Xu J, Brennan TJ (2010) Guarding pain and spontaneous activity of nociceptors after skin versus skin plus deep tissue incision. *Anesthesiology* **112**(1)**:** 153-164

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**(5)**:** 501-509

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*

Yan JJ, Jung JS, Lee JE, Lee J, Huh SO, Kim HS, Jung KC, Cho JY, Nam JS, Suh HW, Kim YH, Song DK (2004) Therapeutic effects of lysophosphatidylcholine in experimental sepsis. *Nat Med* **10**(2)**:** 161-167

Yang H, Yu Y, Li WG, Yu F, Cao H, Xu TL, Jiang H (2009) Inherent dynamics of the acid-sensing ion channel 1 correlates with the gating mechanism. *PLoS Biol* **7**(7)**:** e1000151

Yen YT, Tu PH, Chen CJ, Lin YW, Hsieh ST, Chen CC (2009) Role of acid-sensing ion channel 3 in sub-acute-phase inflammation. *Mol Pain* **5:** 1

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**(17)**:** 6752-6757

Yiangou Y, Facer P, Dyer NH, Chan CL, Knowles C, Williams NS, Anand P (2001a) Vanilloid receptor 1 immunoreactivity in inflamed human bowel. *Lancet* **357**(9265)**:** 1338-1339

Yiangou Y, Facer P, Smith JA, Sangameswaran L, Eglen R, Birch R, Knowles C, Williams N, Anand P (2001b) Increased acid-sensing ion channel ASIC-3 in inflamed human intestine. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **13**(8)**:** 891-896

Yoshida K, Kakihana M, Chen LS, Ong M, Baird A, Gage FH (1992) Cytokine regulation of nerve growth factor-mediated cholinergic neurotrophic activity synthesized by astrocytes and fibroblasts. *J Neurochem* **59**(3)**:** 919-931

Yu J, Lou GD, Yue JX, Tang YY, Hou WW, Shou WT, Ohtsu H, Zhang SH, Chen Z (2013) Effects of histamine on spontaneous neuropathic pain induced by peripheral axotomy. *Neurosci Bull* **29**(3)**:** 261-269

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**(1)**:** 61-72

Yuan FL, Chen FH, Lu WG, Li X, Li JP, Li CW, Xu RS, Wu FR, Hu W, Zhang TY (2010a) Inhibition of acid-sensing ion channels in articular chondrocytes by amiloride attenuates articular cartilage destruction in rats with adjuvant arthritis. *Inflamm Res* **59**(11)**:** 939-947

Yuan FL, Chen FH, Lu WG, Li X, Wu FR, Li JP, Li CW, Wang Y, Zhang TY, Hu W (2010b) Acid-sensing ion channel 1a mediates acid-induced increases in intracellular calcium in rat articular chondrocytes. *Mol Cell Biochem* **340**(1-2)**:** 153-159

Zahn PK, Subieta A, Park SS, Brennan TJ (2004) Effect of blockade of nerve growth factor and tumor necrosis factor on pain behaviors after plantar incision. *J Pain* **5**(3)**:** 157-163

Zelcer S, Kolesnikov Y, Kovalyshyn I, Pasternak DA, Pasternak GW (2005) Selective potentiation of opioid analgesia by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Brain Res* **1040**(1-2)**:** 151-156

Zha XM, Wemmie JA, Green SH, Welsh MJ (2006) Acid-sensing ion channel 1a is a postsynaptic proton receptor that affects the density of dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(44)**:** 16556-16561

Zhang M, Gong N, Lu YG, Jia NL, Xu TL, Chen L (2008) Functional characterization of acid-sensing ion channels in cultured neurons of rat inferior colliculus. *Neuroscience* **154**(2)**:** 461-472

Zhang M, Wang H, Tracey KJ (2000) Regulation of macrophage activation and inflammation by spermine: a new chapter in an old story. *Crit Care Med* **28**(4 Suppl)**:** N60-66

Zhang Q, Sitzman LA, Al-Hassani M, Cai S, Pollok KE, Travers JB, Hingtgen CM (2009) Involvement of platelet-activating factor in ultraviolet B-induced hyperalgesia. *J Invest Dermatol* **129**(1)**:** 167-174

Zhang Y, Meng X, Li A, Xin J, Berman BM, Lao L, Tan M, Ren K, Zhang RX (2012) Electroacupuncture alleviates affective pain in an inflammatory pain rat model. *Eur J Pain* **16**(2)**:** 170-181

Zhao X, Gorin FA, Berman RF, Lyeth BG (2008) Differential hippocampal protection when blocking intracellular sodium and calcium entry during traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* **25**(10)**:** 1195-1205

Zhao ZQ (2008) Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. *Prog Neurobiol* **85**(4)**:** 355-375

Ziemann AE, Schnizler MK, Albert GW, Severson MA, Howard MA, 3rd, Welsh MJ, Wemmie JA (2008) Seizure termination by acidosis depends on ASIC1a. *Nat Neurosci* **11**(7)**:** 816-822

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**(7146)**:** 855-858