



HAL
open science

Rôle du canal sodique Nav1.9 dans la douleur inflammatoire, dans la perception du froid et dans l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine

Stéphane Lolignier

► **To cite this version:**

Stéphane Lolignier. Rôle du canal sodique Nav1.9 dans la douleur inflammatoire, dans la perception du froid et dans l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2011. Français. NNT : 2011CLF1MM28 . tel-00855512

HAL Id: tel-00855512

<https://theses.hal.science/tel-00855512>

Submitted on 29 Aug 2013

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

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

UNIVERSITE BLAISE PASCAL
Année 2011

UNIVERSITE D'AUVERGNE
N° ordre : 28-DOC

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité Neurosciences

Soutenue le 16 décembre 2011

Stéphane LOLIGNIER

Rôle du canal sodique Nav1.9 dans la douleur inflammatoire, dans la perception du froid et dans l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine

Président du jury : Dr Patrick DELMAS (Université de la Méditerranée, Marseille)
Directeur de thèse : Pr Alain ESCHALIER (Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand)
Co-directeur de thèse : Dr Jérôme BUSSEROLLES (Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand)
Rapporteurs : Dr Emmanuel BOURINET (Université de Montpellier I, Montpellier)
Pr Rémy SCHLICHTER (Université Louis Pasteur, Strasbourg)

UMR 766 INSERM/UdA
Laboratoire de Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur
Faculté de Médecine/Pharmacie, 28 place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand

RESUME

Les canaux sodiques dépendants du voltage, ou canaux Nav, jouent un rôle capital dans l'excitabilité neuronale, dans la genèse et dans la propagation des potentiels d'action. Au sein de cette famille, le canal Nav1.9 se distingue par une expression restreinte aux nocicepteurs et par des propriétés électrophysiologiques uniques qui, si elles excluent sa contribution à la phase dépolarisante du potentiel d'action, lui confèreraient un rôle dans la modulation de l'excitabilité des nocicepteurs. Ce travail de thèse vise à caractériser son implication dans la physiopathologie de la douleur par une approche comportementale, moléculaire et fonctionnelle.

La première partie de ce travail consiste à étudier la contribution du canal Nav1.9 à la douleur inflammatoire. Nous avons donc réalisé différents tests comportementaux chez des souris knock-out (KO) et des rats traités par antisens (knock-down) modèles de douleur inflammatoire (aigu, subaigu, chronique). L'expression du canal ainsi que ses propriétés électrophysiologiques sont ensuite analysées chez ces mêmes modèles animaux. Notre premier constat est que le canal Nav1.9 n'est pas impliqué dans la réponse à une stimulation mécanique ou thermique chaude nociceptive chez des animaux sains. En revanche, l'hypersensibilité douloureuse thermique et mécanique induite par une inflammation subaiguë (carragénine intraplantaire) ou chronique (monoarthrite) est significativement réduite chez la souris KO Nav1.9. Un résultat similaire est obtenu par traitement antisens chez le rat, sur le modèle d'inflammation subaiguë. Chez la souris, suite à l'induction d'une inflammation subaiguë, une légère diminution suivie d'une forte augmentation de l'expression protéique du canal Nav1.9 est observée dans les ganglions rachidiens innervant la patte enflammée. Une augmentation de la quantité de canaux est également observée au niveau des troncs nerveux cutanés innervant cette même zone. Les canaux néosynthétisés ne contribuent pas au courant sodique enregistré en patch clamp dans les corps cellulaires des neurones des ganglions rachidiens, mais nos données suggèrent qu'ils sont exportés en direction des terminaisons nerveuses, où ils pourraient devenir fonctionnels et augmenter l'excitabilité cellulaire.

La deuxième partie de ce travail de thèse consiste à caractériser l'implication de canal Nav1.9 dans la perception du froid et dans l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine. Nous avons en effet observé de manière inattendue que les souris KO Nav1.9 présentent des seuils de douleur au froid (<10°C) plus élevés que les souris sauvages. Ce phénomène est confirmé par plusieurs tests comportementaux chez les souris KO et chez des rats traités par antisens anti-Nav1.9. L'oxaliplatine, prescrit dans le traitement des cancers colorectaux, est connu pour induire une hypersensibilité au froid invalidante chez la majorité des patients. Nous avons donc décidé d'étudier la contribution du canal Nav1.9 à ce symptôme. Suite à une injection unique d'oxaliplatine, une forte hypersensibilité au froid apparaît chez les souris dès 20°C. Nous montrons que le KO Nav1.9 permet de supprimer l'hypersensibilité au froid aux températures normalement non douloureuses (20 et 15°C, allodynie), et de réduire l'hypersensibilité aux températures douloureuses (10 et 5°C, hyperalgie). Le même effet est observé chez le rat après traitement antisens.

En conclusion, ce travail permet de mettre en évidence l'intérêt du canal Nav1.9 en tant que cible pharmacologique potentielle pour le traitement de douleurs inflammatoires et de l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine. Il est de plus intéressant de constater que les seuils de réponse à des stimuli nociceptifs ne sont pas perturbés chez les souris KO Nav1.9 saines, à l'exception de la douleur provoquée par des températures froides extrêmes. Le blocage du canal Nav1.9 aurait donc des propriétés anti-hyperalgiques plutôt qu'antalgique, ce qui est conceptuellement intéressant.

ABSTRACT

Voltage-gated sodium channels, or Nav channels, play a key role in neuronal excitability and in the emission and propagation of action potentials. Among the different Nav isoforms, Nav1.9 is only expressed in nociceptors and shows atypical electrophysiological properties which, if they exclude a possible contribution to the depolarizing phase of the action potential, could be important for the modulation of nociceptors' excitability. This study aims to characterize the Nav1.9 implication in the pathophysiology of pain using behavioral, molecular and functional approaches.

The first part of this work is to assess the Nav1.9 contribution to inflammatory pain. Therefore we have performed several behavioral tests in different inflammatory pain models (acute, subacute, chronic), using knock-out (KO) mice and rats treated with antisense oligodeoxynucleotides. Nav1.9 expression and electrophysiological properties are then analyzed within the same animal models. First, we observe that Nav1.9 channels do not contribute to pain perception in response to noxious heat or pressure in healthy animals. However, thermal and mechanical pain hypersensitivity induced by subacute (intraplantar carrageenan) or chronic (monoarthritis) inflammation is significantly lowered in Nav1.9 knock-out mice. Similar results are obtained on the subacute inflammation model using a knock-down strategy in rats. A weak reduction followed by a strong increase in Nav1.9 protein expression is observed in mice dorsal root ganglions innervating the inflamed paw during subacute inflammation. We also observe an increase in Nav1.9 immunolabeling in cutaneous nerve trunks innervating this zone. Whereas the newly produced channels do not contribute to the sodium current recorded in dorsal root ganglion cell bodies, as assessed by patch clamp, our data suggest that they are transported to nerve terminals where they could become functional and increase neuronal excitability.

In the second part of this study, we aim to characterize the implication of Nav1.9 channels in cold perception and in oxaliplatin-induced cold hypersensitivity. Indeed, we surprisingly observed that Nav1.9 KO mice showed higher pain thresholds to intense cold (<10°C) than wild-type mice. This observation is confirmed by several behavioral tests in KO mice and in antisense-treated rats. As oxaliplatin (a platinum salt used to treat colorectal cancer) is known to induce cold pain hypersensitivity in most of the patients, we decided to study the Nav1.9 contribution to this symptom. Following acute oxaliplatin injection, a strong cold hypersensitivity is observed in wild-type mice at 20°C and below. We show that Nav1.9 KO results in a suppression of cold hypersensitivity to non-noxious temperatures (20 and 15°C, allodynia), and a reduction of hypersensitivity to noxious cold (10 and 5°C, hyperalgesia). A similar observation is made using Nav1.9 knock-down in rats.

To conclude, our data shows that Nav1.9 could be potentially a good target to treat acute to chronic inflammatory pain, as well as oxaliplatin-induced cold hypersensitivity. Furthermore, as Nav1.9 is not involved in defining pain thresholds of healthy animals (except for noxious cold), its blockade would have anti-hyperalgesic rather than analgesic effects, which is conceptually interesting.

REMERCIEMENTS

Aux membres de mon jury...

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement mon directeur de thèse, le professeur **Alain Eschalié**, pour son accueil au sein de l'unité INSERM 766 qu'il dirige. Sa passion communicative pour la science est le moteur de cette unité et je souhaite sincèrement pouvoir faire preuve d'autant de jeunesse d'esprit et d'enthousiasme tout au long de ma carrière. La confiance et la liberté qu'il m'a accordées ont été stimulantes et m'ont permis de m'épanouir scientifiquement et personnellement au travers de cette thèse. Son expérience et sa volonté de recadrer sans cesse nos recherches en direction de (et en provenance de) la clinique ont aussi joué un rôle important dans ce travail. Pour toutes ces raisons, et bien d'autres, je lui resterai très reconnaissant et le considérerai comme celui qui m'a mis sur les rails de la recherche.

Mes pensées s'adressent également au docteur **Jérôme Busserolles** qui a co-encadré ma thèse. Son soutien, tant sur le plan scientifique qu'humain, a été indispensable à la réussite de ce travail. J'ai beaucoup apprécié sa grande disponibilité et l'aide précieuse qu'il m'a apportée tout au long de la thèse. Jérôme a su être pour moi un encadrant de qualité autant qu'un ami, pratiquant un savant mélange de conseils de fond et de blagues potaches. Je lui souhaite de réaliser le brillant parcours qu'il mérite et espère que nous aurons l'opportunité de retravailler ensemble dans le futur.

Je tiens aussi à remercier le docteur **Patrick Delmas**, directeur de l'équipe "Transduction Sensorielle et Canaux Ioniques" à l'UMR 6231 CNRS/Université de la Méditerranée (Marseille), dont la contribution à ce travail de thèse a été essentielle. J'ai beaucoup apprécié son investissement, sa disponibilité ainsi que la justesse et la pertinence de ses réflexions sur mon travail. Je tiens à le remercier aussi pour son accueil lors de mes séjours à Marseille. Travailler avec Patrick a été une expérience très agréable et enrichissante.

Merci également au docteur **Emmanuel Bourinet** (UMR CNRS 5203, Institut de Génétique Fonctionnelle, Université de Montpellier I) et au professeur **Rémy Schlichter** (UPR CNRS 3212, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Université Louis Pasteur, Strasbourg) d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse et de juger le présent travail. Si je regrette l'absence de Remy Schlichter à mon jury de thèse en raison de la tempête « Joachim » qui a frappé la France ce jour-là, je tiens à les remercier tous les deux pour leur analyse poussée et très pertinente de mon travail, tant sur des questions techniques que sur le fond scientifique.

Aux "mécènes"...

Je me dois également de remercier les organismes qui ont rendu possible ma thèse par leur support financier : le **Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie** ainsi que la **Ligue contre le Cancer** pour m'avoir financé pendant ces 4 années ; et l'**Agence Nationale de la Recherche** et l'**Association pour la Recherche sur le Cancer - Institut National du Cancer** pour leur support financier dans la réalisation de ce travail. Merci également au **Conseil Régional d'Auvergne** qui m'a permis de présenter mes résultats au 13^{ème} Congrès Mondial de la Douleur de Montréal.

A la team 766...

J'ai beaucoup de monde à remercier au sein de cette équipe qui est devenue au fil des mois et des années une véritable famille que je quitte non sans émotion. Un grand merci à **Monique** (justement nommée Magic'Monique) et **Eric** (dit Maurice Chafouin pour une raison que seule Monique pourra expliquer) qui ont endossé, en plus de leur fonction de techniciens, la charge de "maman et papa" des nombreux étudiants qui grouillent dans les salles de manip. Par leurs styles différents mais terriblement complémentaires, ils contribuent fortement à l'ambiance (comme à la production scientifique) de ce laboratoire. Merci également à **Anne-Marie** et **Maryse** pour leur appui technique et administratif. Nouvelle venue dans cette équipe haute en couleur, je souhaite à **Claire** de s'y épanouir. Autre personne sans qui rien ne serait possible, je tiens à remercier notre secrétaire **Sylvie**. Sa capacité à régler les problèmes et à déplacer les montagnes de l'administration pousse à l'admiration. Merci aussi à **Mireille** pour avoir fait de ce laboratoire un endroit agréable à vivre et pour garder toujours le sourire. Je ne dois pas oublier **Martine** (ok, Tiatia), ancienne technicienne qui a préféré troquer l'immersion de la patte contre les analyses sanguines (incompréhensible...). Elle fût la cible parfaite de nos taquineries avec un répondant toujours à la hauteur. Je me dois de remercier aussi **Hervé** et **Rémi**, héros de l'informatique élevés au rang de demi-dieux, qui m'ont permis plus d'une fois d'échapper au chômage technique. Enfin, merci à **Franck** et **Didier** pour les soins qu'ils ont pu apporter à mes nombreux petits protégés de l'animalerie, ainsi qu'à **Karim** pour le travail pas toujours évident qu'il exerce au sein de cette unité de stabulation.

Merci à **Agathe** qui m'a confié la responsabilité de ses chères petites têtes blondes de l'IUT (terme un peu réducteur au vu de la variété de styles capillicoles représentés, mêlant dreadlocks et queue de cheval) pour des séances de TP riches en émotion où "physiologie" rimait avec "réanimation d'étudiants". Merci aussi à **Denis**, **Christine** et **Laurence**, nos professeurs, pour les enseignements dont j'ai pu profiter en master, et pour les discussions scientifiques et moins scientifiques que l'on a pu avoir après que je sois passé du statut d'étudiant à celui... d'étudiant en thèse. A la jeune génération (disons "entre deux âges") qui compte des individus plus étranges les uns que les autres tels que **Totoff** (Benjamin Button altiligérien), **Fred** (The American), **Fred** (l'autre, issu d'une expérience scientifique visant à croiser Pierre Desproges, Bertrand Du Guesclin et un moine trappiste), **David** (quand le heavy metal rencontre l'accent lozérien), **Fabien** (Rick Hunter anglais, doté de la capacité à voir à travers ses paupières), **Emilie** (dont la capacité à tenir l'alcool m'a fait douter de l'intérêt d'un post-doc au Canada) et **Céline** (mélange troublant d'humour borderline, de rigueur scientifique et de prouesses pâtisseries, toujours membre de l'équipe à titre honorifique), à tous donc, merci pour donner à cette équipe la cohésion et la bonne ambiance qui la caractérise et qui nous rend tous fier d'en faire partie.

J'en arrive enfin au prolétariat, à la chaire à paillasse, bref, à ceux qui travaillent sans compter pour s'offrir un futur improbable, je veux dire les thésards et post-docs. Merci à toi **David** pour ces rigolades, nos désaccords de principe sans fin mais au fond tellement plaisants, tes leçons de danse à la limite de rendre aveugle et ton amour déraisonnable pour le Cantal. Je te souhaite de t'éclater dans le grand nord et espère qu'on aura moult occasions de se revoir, ne serait-ce que pour un tour de barque à Central Park ! La dream-team des thésards ne pourrait pas non plus compter sans **Mathieu**, dont la capacité à enchaîner débats philosophiques, analyses rugbalistiques pointues et chanson française de qualité variable (mais d'interprétation toujours décoiffante) en fait un compagnon de soirée indispensable. Je te souhaite le meilleur, tu le mérites, et ce même si tu persistes à vouloir à tout prix travailler sur le... côté obscur de la douleur. **Nico**, véritable serial-lover du ch'nord, ta passion pour les frites et la bière est un exemple à suivre. Outre la pratique d'un anglais *fluent* qui t'ouvrira les portes du nouveau monde, je te souhaite à toi aussi plein de bonnes choses. J'en arrive à **Maily** et

Vaness, couple portugo-vietnamien fusionnel que seule l'attribution d'une dernière gorgée de mojito pourrait conduire à la dispute. Vaness, merci de m'avoir initié au bonheur incommensurable du R'n'B français, d'avoir inventé le concept de la choupitude, et de garder là où il est ton bol gastrique la prochaine fois qu'on sort ! Maily, j'espère que tu vas pouvoir trouver le post-doc qui te convient (malgré cette légère odeur de friture caractéristique), il y a tant de carreaux à laver sans les mains de par le monde... **Anneso**, toi qui as déjà trouvé un endroit où passer les deux à huit prochaines années de ta vie, je te souhaite d'y vivre une bonne expérience et de nous revenir bardée de *Nature* et de *Science*. Anyway, je ne m'inquiète pas quant à ta capacité à intégrer la vie américaine ! **Steph**, j'espère que tout va rouler pour toi aussi sur la terre des cowboys. Je te souhaite également bien du courage pour te remettre de la fessée que va infliger l'ASM au Stade Toulousain cette année (ce manuscrit en est témoin). A la jeunesse de la jeunesse, j'ai nommé les piou-piou **Amandine, Véro, Jérem, Romain et Ludivine**, je vous souhaite à tous... bien du courage ! Non, la thèse est une expérience magnifique dont vous avez déjà eu un sérieux aperçu et il n'est pas impossible que vous en sortiez sains d'esprit (quoi que pour certains d'entre vous ce soit mal engagé). Gardez la funkitude qui est en vous ! **Wassim et Loreto**, j'espère que vous garderez un bon souvenir de votre expérience clermontoise, et quelques beaux papiers aussi. Courage, après le post-doc, il y a ~~un autre post-doc~~ un vrai travail à la clé. A mon tour de vous rejoindre dans cette aventure... Enfin, j'ai une pensée émue pour ceux qui sont déjà partis aux quatre coins du monde que sont le Texas et le Royaume-Uni : **Julien**, et **Xav**. Merci de m'avoir guidé dans la jungle de la recherche universitaire (à grands coups de rhum arrangé) à l'époque où j'étais moi-même un piou-piou. J'espère qu'on aura l'occasion de se retrouver !

Aux marseillais...

Pour le précieux travail qu'ils ont réalisé sur ce projet, et pour leurs conseils scientifiques, merci à **François, Françoise, Mélanie, Murielle, Lise** et **Christelle**. Merci aussi à **Nancy, Bertrand** et **Alex** qui ont aussi contribué à l'accueil agréable que j'ai reçu à Marseille.

A mes proches...

Merci à **mes parents**, à **Pascal**, à **Gilles**, à **Michelle**, et à **toute ma famille** d'avoir toujours été là pour moi, et ce malgré mon manque chronique de disponibilité. Votre soutien a été très précieux pour moi. Merci aussi à tous mes "vieux potes", avec une pensée particulière pour **Brian, Cyril, Thibault, Brundu, Annouk, Nonore, Thibaud, Pépé, Benji, Emilie, Mat-mat, Mélanie B, Buzzito, Mélanie B** (l'autre), **Marie** et **Mylène**. Quel plaisir de poser le cerveau et de venir me ressourcer avec vous ! Sachez que le week-end de l'intelligence, les vendanges d'Enval, le trip annuel au départ de Gérone et la désormais célèbre semaine vin-vélo-pétanque du 14 juillet resteront des priorités pour moi.

Enfin, merci à toi **Florence** d'avoir partagé ma vie pendant ces années, dans les périodes fastes et les moments plus difficiles. Ton amour et ton soutien ont été pour moi très importants dans la réussite de ce projet personnel. J'espère que beaucoup d'autres joies nous attendent...

LISTE DES PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS

Publications

Nav1.9 channel contributes to mechanical and heat pain hypersensitivity induced by subacute and chronic inflammation.

Lolignier S, Amsalem M, Maingret F, Padilla F, Gabriac M, Chapuy E, Eschalier A, Delmas P, Busserolles J
Original article, *PLoS One* 6(8): e23083 (2011)

Metabolic changes detected by proton magnetic resonance spectroscopy in vivo and in vitro in a murin model of Parkinson's disease, the MPTP intoxicated mouse.

Chassain C, Bielicki G, Durand E, Lolignier S, Essafi F, Traoré A, Durif F
Original article, *J Neurochem* 105(3):874-82 (2008)

Gating modifier peptides of Nav1.9 channels in the treatment of inflammatory pain.

Gaudioso-Tyzra C, Rodat-Despoix L, Gabriac M, Lolignier S, Delmas P
Original article, submission in progress

Nav1.9 channel is involved in cold pain and oxaliplatin-induced cold allodynia

Lolignier S, Gaudioso-Tyzra C, Rodat-Despoix L, Maingret F, Legha W, Chapuy E, Eschalier A, Delmas P, Busserolles J
Original article, in preparation

Nav1.9, sleepy but painful

Delmas P, Maingret F, Padilla F, Lolignier S, Eschalier A
Invited review, in preparation

Posters

Implication du canal sodique Nav1.9 dans la physiopathologie de la douleur inflammatoire

Lolignier S, Busserolles J, Luccarini P, Padilla F, Delmas P, Dallel R, Eschalier A
Journée de la Recherche - IFR 79 Santé Auvergne, Clermont-Ferrand, France (2007)
3^{ème} Congrès National de Physiologie, Pharmacologie et Thérapeutique, Clermont-Ferrand, France (2008)

Specific involvement of the voltage-gated sodium channel Nav1.9 in inflammatory pain

Lolignier S, Busserolles J, Maingret F, Padilla F, Gabriac M, Chapuy E, Delmas P, Eschalier A
13th World Congress on Pain, Montréal, Canada (2010)

Nav1.9 channel contributes to mechanical and heat pain hypersensitivity induced by subacute and chronic inflammation

Lolignier S, Amsalem M, Maingret F, Padilla F, Gabriac M, Chapuy E, Eschalier A, Delmas P, Busserolles J
New Frontiers in Persistent Pain - Abcam international meeting, Paris, France (2011)

Communications orales

Contribution spécifique du canal sodique Nav1.9 à l'hypersensibilité douloureuse inflammatoire

Lolignier S, Busserolles J, Maingret F, Gabriac M, Delmas P, Eschalier A

6ème symposium national du Réseau Recherche sur la Douleur, Marseille, France (2010)

Journée de l'Ecole Doctorale, Clermont-Ferrand, France (2010)

Implication spécifique du canal sodique Nav1.9 dans l'hypersensibilité douloureuse inflammatoire

Lolignier S, Busserolles J, Maingret F, Padilla F, Gabriac M, Chapuy E, Delmas P, Eschalier A

Journée de la Recherche - IFR 79 Santé Auvergne, Clermont-Ferrand, France (2010)

SOMMAIRE

Sommaire.....	1
Abréviations.....	5
Figures & tableaux.....	7
Introduction et bases bibliographiques	9
I. Préambule	11
II. Le système nerveux nociceptif périphérique	15
1. Anatomie	17
1.1. L'innervation rachidienne	18
1.2. L'innervation crânienne	20
2. Diversité fonctionnelle des fibres afférentes primaires.....	21
2.1. Fibres à bas seuil d'activation	23
2.1.1. Mécanorécepteurs tactiles cutanés.....	23
2.1.2. Propriocepteurs	26
2.1.3. Thermorécepteurs	26
2.2. Nocicepteurs.....	28
2.2.1. Fibres A δ nociceptives	29
2.2.2. Fibres C nociceptives.....	30
3. Projections centrales du système somesthésique périphérique	33
III. La transduction nociceptive et le rôle clé des canaux Nav	37
1. Canaux transducteurs.....	39
2. Canaux sodiques dépendants du voltage.....	43
2.1. Structure	43
2.2. Diversité des sous-unités α	45
2.2.1. Intérêt de cette diversité pour la pharmacologie des canaux Nav	46
2.2.2. Nav1.1.....	47
2.2.3. Nav1.2.....	49
2.2.4. Nav1.3.....	49
2.2.5. Nav1.6.....	50
2.2.6. Nav1.7.....	51
2.2.7. Nav1.8.....	53
2.2.8. Nav1.9.....	56
Contribution du canal Nav1.9 à la douleur inflammatoire	59
I. Introduction.....	61
1. La réaction inflammatoire	61

Sommaire

2. Intégration de l'environnement inflammatoire par les fibres afférentes primaires.....	62
3. Régulation du canal Nav1.9 par l'inflammation	67
II. Objectifs.....	73
III. Résultats	75
1. Données comportementales	75
1.1. Inflammation aiguë.....	75
1.2. Inflammation subaiguë	76
1.3. Inflammation chronique (monoarthrite)	81
2. Régulation du canal Nav1.9 par l'inflammation	84
IV. Discussion & Perspectives	89
1. Implication du canal Nav1.9 dans la douleur inflammatoire	89
2. Régulation du canal Nav1.9 par l'inflammation	90
3. Perspectives.....	95
V. Article	97
Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine	109
I. Introduction	111
1. Les acteurs moléculaires de la sensibilité au froid physiologique.....	111
1.1. TRPM8.....	112
1.2. TRPA1.....	115
1.3. TREK-1/TREK-2/TRAAK.....	118
1.4. Nav1.8.....	121
2. L'hypersensibilité au froid iatrogène : cas de l'oxaliplatine	122
2.1. Neurotoxicité sensorielle de l'oxaliplatine : constat clinique	123
2.2. Les mécanismes sous-jacents	125
II. Objectifs.....	129
III. Résultats	131
1. Rôle du canal Nav1.9 dans la sensibilité au froid	131
2. Rôle du canal Nav1.9 dans l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine.....	136
IV. Discussion & Perspectives	141
1. Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid intense	141
1.1. Observations comportementales	141
1.2. Mécanisme d'implication.....	143
1.3. Perspectives	147
2. Rôle du canal Nav1.9 dans l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine.....	150
Conclusion générale	153

Matériel et méthodes	155
1. Animaux.....	155
1.1. Souches transgéniques	156
1.2. Modèles et traitements	157
2. Tests comportementaux	158
2.1. Test de douleur aiguë spontanée (formol)	158
2.2. Test de von Frey.....	158
2.3. Dynamic Weight Bearing	159
2.4. Test de pression de la patte.....	160
2.5. Tests d'immersion de la patte et de la queue.....	160
2.6. Test de préférence thermique	161
2.7. Test de la plaque froide	161
2.8. Test de la rampe froide.....	161
2.9. Test de l'acétone.....	162
3. Immunohistochimie	162
4. RT-PCR quantitative.....	163
4.1. Extraction d'ARN et rétrotranscription	163
4.2. qPCR.....	164
5. Electrophysiologie	165
5.1. Culture primaire de neurones sensoriels.....	166
5.2. Patch clamp	166
6. Imagerie métabolique	166
7. Analyses statistiques	167
Références	169

ABREVIATIONS

5-HT : 5-Hydroxytryptamine ou sérotonine	NGF : Nerve Growth Factor (facteur de croissance des nerfs)
ADN : Acide Désoxyribonucléique	NMDA : N-méthyl-D-aspartate
ARN : Acide Ribonucléique	n.s. : Non Significatif
AITC : Allyl-isothiocyanate (isothiocyanate d'allyle)	ODN : Oligodéoxynucléotide
AMH : A-fibre Mecano-Heat-sensitive (fibre A δ polymodale)	oxaPt : Oxaliplatine
ASIC : Acid-Sensing Ionic Channel (canal ionique senseur de l'acidité)	PA : Potentiel d'Action
ATP : Adénosine Tri-Phosphate	PBS : Phosphate Buffer Saline (tampon phosphate)
BDNF : Brain Derived Neurotrophic Factor (facteur neurotrophique dérivé du cerveau)	PGE₂ : Prostaglandine E2
CCI : Chronic Constriction Injury (ligature du nerf sciatique)	PGI₂ : Prostaglandine I2
CFA : Complete Freund Adjuvant (Adjuvant complet de Freund)	PKA : Protéine Kinase A
CGRP : Calcitonin-Gene Related Peptide (peptide relié au gène calcitonine)	PKC : Protéine Kinase C
CHO : Chinese Hamster Ovary (lignée de cellules ovariennes de hamster chinois)	PLC : Phospholipase C
CMH : C-fibre Mecano-Heat-sensitive (fibre C polymodale)	RCPG : Récepteur Couplé à une Protéine G
DRG : Dorsal Root Ganglion (ganglion rachidien dorsal)	SNC : Système Nerveux Central
FAP : Fibre Afférente Primaire	SNI : Spared Nerve Injury (section du nerf péronéal)
GAPDH : Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase	SNL : Spinal Nerve Ligation (ligature du nerf spinal)
GDNF : Glial cell line Derived Neurotrophic Factor (facteur neurotrophique dérivé des gliocytes)	TRAAK : Tandem pore domain weak inward rectifying K ⁺ (TWIK) related arachidonic acid-stimulated K ⁺ channel (canal relié aux canaux à faible courant rectifiant K ⁺ et à deux domaines pore, stimulé par l'acide arachidonique)
GMPc : Ganosine Monophosphate cyclique	TG : Trigeminal Ganglion (ganglion trigéminal)
GTP : Guanosine TriPhosphate	TREK : Tandem pore domain weak inward rectifying K ⁺ (TWIK) Related K ⁺ Channel (canal relié aux canaux à faible courant rectifiant K ⁺ et à deux domaines pore)
HEK : Human Embryonic Kidney cells (lignée de cellules rénales embryonnaires humaines)	TRP : Transient Receptor Potential (potentiel récepteur transitoire)
HEPES : Acide 4-(2-HydroxyEthyl)-1-Pipérazine Ethane Sulfonate	TTX : tétrodotoxine (suivi de "-R" pour "résistant", et de "-S" pour "sensible")
HPRT : Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyltransferase	WDR : Wide Dynamic Range (neurone à convergence)
IB4 : Isolectine B4	WT : Wild-type (type sauvage)
KO : Knock-out	

FIGURES & TABLEAUX

Figure 1. Les voies du tact et de la nociception.	16
Figure 2. Innervation de la moelle épinière par les FAP et structuration des nerfs périphériques.	18
Figure 3. Les nerfs rachidiens et leurs territoires d'innervation cutanée.	19
Figure 4. Innervation somesthésique de la face.	20
Tableau 1. Caractéristiques et fonctions des différents types de fibres afférentes primaires.	21
Figure 5. Impact de la vitesse de conduction des FAP sur la nociception.	22
Figure 6. Vision schématique d'une coupe de peau, illustrant les différents récepteurs sensoriels, leur morphologie, et leurs positions respectives.	24
Figure 7. Les quatre types de mécanorécepteurs à bas seuil de la peau glabre.	25
Figure 8. Fréquence moyenne de décharge des thermorécepteurs au froid et au chaud en fonction de la température.	27
Figure 9. Répartition des fibres C enregistrées au niveau de la peau humaine.	30
Figure 10. Les principaux marqueurs cellulaires des neurones des DRG chez le rat.	32
Figure 11. Projections centrales des fibres afférentes primaires.	33
Figure 12. Résumé schématique des fonctions jouées par les canaux ioniques dans les nocicepteurs.	39
Tableau 2. Transducteurs moléculaires des fibres afférentes primaires.	41
Figure 13. Structure secondaire des canaux sodiques dépendants du voltage.	43
Tableau 3. Propriétés et principaux territoires d'expression des canaux Nav.	45
Figure 14. Distance génétique entre les différents canaux Nav chez le rat.	46
Figure 15. Principaux modèles de neuropathie traumatique utilisés chez l'animal.	48
Figure 16. Efficacité antalgique du bloqueur des canaux Nav1.8 A-803467 dans différents modèles de douleur chez le rat.	55
Figure 17. Intégration de l'environnement inflammatoire par les nocicepteurs.	65
Figure 18. Signalisation impliquée dans la sensibilisation des nocicepteurs par l'inflammation - l'exemple du canal TRPV1.	66
Tableau 4. Synthèse bibliographique des études de l'expression de Nav1.9 chez des modèles animaux d'inflammation.	69
Tableau 5. Synthèse bibliographique des études comportementales chez la souris KO Nav1.9 ou le rat knock-down.	71
Figure 19. Evaluation de la douleur inflammatoire aiguë spontanée chez les souris KO Nav1.9.	76
Figure 20. Evolution de l'œdème induit par injection intraplantaire de carragénine 2 et 3% chez des souris sauvages et KO Nav1.9.	76
Figure 21. Impact du KO Nav1.9 sur la sensibilité thermique et mécanique de souris après injection intraplantaire de carragénine 2 et 3%.	77
Figure 22. Effet d'une inflammation plantaire subaiguë sur la distribution pondérale de souris WT et KO Nav1.9.	78
Figure 23. Validation du knock-down chez le rat par immunohistochimie.	79
Figure 24. Impact du knock-down Nav1.9 sur l'hypersensibilité douloureuse inflammatoire chez le rat.	80
Figure 25. Visualisation de l'activité métabolique au niveau de l'articulation tibio-tarsale chez la souris monoarthritique.	81
Figure 26. Evolution de l'œdème induit par la monoarthrite chez les souris WT et KO Nav1.9.	81
Figure 27. Effet du KO Nav1.9 sur la sensibilité thermique de souris monoarthritiques.	82
Figure 28. Impact du KO Nav1.9 sur la distribution pondérale d'animaux monoarthritiques.	83
Figure 29. Impact de l'inflammation sur la transcription du canal Nav1.9 évaluée par qPCR.	84
Figure 30. Effet de l'inflammation subaiguë sur l'expression protéique du canal Nav1.9.	85
Figure 31. Quantité de canaux Nav1.9 dans les nocicepteurs cutanés innervant la patte enflammée.	86
Figure 32. Propriétés électrophysiologiques du canal Nav1.9 dans les neurones de DRG d'animaux enflammés.	87
Figure 33. Expérience proposée pour l'évaluation du pool vésiculaire de canaux Nav1.9 dans des neurones en culture.	92
Figure 34. Modèle de régulation des canaux Nav1.9 par l'inflammation.	94

Figures & tableaux

Préambule

Figure 35. Le canal TRPM8 de rat.	112
Figure 36. Distribution des canaux TRPM8, TRPA1 et TRPV1 dans les différents types de fibres afférentes primaires.	115
Figure 37. Mécanisme présumé impliquant les canaux TREK-1 et TRAAK dans la transduction du froid.	120
Figure 38. Structures des sels de platine de première (cisplatine), deuxième (carboplatine) et troisième (oxaliplatine) génération.	123
Figure 39. Métabolisme de l'oxaliplatine.	124
Figure 40. Sensibilité thermique des souris KO Nav1.9.	131
Figure 41. Détermination du seuil de nociception des souris KO Nav1.9 par le test de la rampe froide.	132
Figure 42. Réponse des souris KO Nav1.9 au test de la plaque froide à 0 et 6°C.	133
Figure 44. Effet du knock-down Nav1.9 sur la sensibilité au froid douloureux chez le rat.	134
Figure 45. Evaluation de la douleur induite par l'injection d'iciline ou de cinnamaldéhyde chez les souris KO Nav1.9.	135
Figure 46. Impact du KO Nav1.9 sur l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine.	137
Figure 47. Effet de l'oxaliplatine sur la préférence thermique chez la souris KO NAV1.9.	138
Figure 48. Evaluation de l'allodynie au froid induite par l'oxaliplatine chez les souris KO Nav1.9.	139
Figure 49. Evaluation de l'hypersensibilité mécanique induite par l'oxaliplatine chez les souris KO Nav1.9.	139
Figure 50. Impact du knock-down de Nav1.9 sur l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine.	140
Figure 51. Contribution du canal Nav1.9 à l'activation neuronale en réponse au froid, à l'AITC et au menthol. .	145
Figure 52. Effet d'un refroidissement sur les propriétés électrophysiologiques des canaux Nav1.8 et Nav1.9. ..	147
Figure 53. Expérience proposée pour mettre en évidence l'éventuelle convergence des mécanismes impliquant Nav1.9, TRPM8 et TRPA1 dans la perception du froid nociceptif.	149
Figure 54. Construction de la souche de souris KO Nav1.9.	156
Figure 55. Exemple d'un résultat de génotypage des souris WT et KO Nav1.9.	157
Figure 56. Kit complet de filaments de von Frey.	159
Figure 57. Le Dynamic Weight Bearing.	160
Tableau 6. Amorces utilisées pour la qPCR.	165



***INTRODUCTION ET BASES
BIBLIOGRAPHIQUES***



I. PREAMBULE

La douleur aiguë est une expérience sensorielle et émotionnelle éprouvante faisant réponse à un stimulus potentiellement nocif¹ (température extrême, pincement, écrasement...), d'où sa qualification de "nociception". Son caractère désagréable permet à l'organisme de préserver son intégrité en adaptant rapidement un comportement destiné à l'évitement du danger, allant du simple réflexe² à un comportement plus élaboré comme la fuite ou la neutralisation du danger. Suite à une lésion tissulaire, la douleur, alors d'origine inflammatoire, permet également de limiter au minimum la sollicitation des tissus atteints (mouvement, trituration ou contact avec un corps étranger) dans le but d'éviter une aggravation de la lésion et de favoriser sa résorption. La nociception est donc un système d'alerte vital, dont la déficience constitue un lourd handicap. L'expérience montre en effet que les personnes souffrant d'insensibilité congénitale à la douleur voient leur espérance de vie diminuer à cause d'un nombre important de blessures (fractures, brûlures...), rarement détectées et prises en charge.

Cette fonction d'alerte est assurée par le système nerveux nociceptif, partie intégrante du système somesthésique (ou somatosensoriel) mettant en jeu des circuits neuronaux dédiés, depuis la transduction du stimulus douloureux à la périphérie (au niveau de l'organe concerné : peau, muscle, viscères...) jusqu'à l'intégration cognitive et émotionnelle du message par les centres nerveux supérieurs. Ce système est soumis à diverses régulations d'ordre physiologique, et notamment hormonales (stress, sexe, rythme circadien...), mais peut également être sujet à des dérèglements pathologiques chroniques dont l'origine peut être lésionnelle (ex : traumatisme nerveux suite à une intervention chirurgicale), métabolique (ex : diabète), toxique (ex : chimiothérapie anticancéreuse, trithérapie antirétrovirale) ou infectieuse (ex : zona). On parle alors de douleurs neuropathiques, puisque la fonction même du système nerveux nociceptif est perturbée. La douleur d'origine inflammatoire peut également s'installer dans la chronicité, selon un mécanisme différent puisque ce n'est pas le fonctionnement des fibres nerveuses qui est en cause, mais une stimulation perpétuelle

¹ L'Association internationale pour l'étude de la douleur (IASP, pour International Association for the Study of Pain) définit la douleur comme "une sensation désagréable et une expérience émotionnelle en réponse à une atteinte tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite en ces termes".

² Dans le cas d'un mouvement réflexe, la douleur n'est ressentie et intégrée qu'*a posteriori*. Elle va cependant conserver un rôle "éducatif", en conditionnant l'individu à ne pas reproduire l'action à l'origine de cette sensation désagréable.

Introduction et bases bibliographiques

Préambule

de ces dernières par un environnement inflammatoire auto-entretenu³. On parle alors de douleur par excès de nociception. Dans tous ces cas, la douleur perd son rôle de système d'alarme et devient alors un fardeau pouvant altérer gravement la qualité de vie.

L'arsenal thérapeutique dont disposent les praticiens pour répondre à la souffrance des patients douloureux chroniques est encore de nos jours très insuffisant, que la douleur soit neuropathique ou d'origine inflammatoire. Des molécules efficaces contre la douleur aiguë existent, mais leurs effets indésirables les rendent incompatibles avec un traitement chronique. C'est par exemple le cas des dérivés opiacés (ex : codéine, tramadol, oxycodone, fentanyl, morphine...) qui ont pour point commun d'induire des effets indésirables tels que la sédation ou la constipation, mais également des phénomènes d'addiction et de tolérance. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens comme l'aspirine, l'ibuprofène ou l'indométacine ont également des propriétés antalgiques, mais vont parallèlement avoir une action délétère importante sur la muqueuse gastro-intestinale, pouvant aller jusqu'à l'ulcération. Si des médicaments antalgiques n'ayant que peu ou pas d'effets indésirables existent, leur efficacité reste malheureusement souvent limitée contre les douleurs d'intensité élevée. On se doit de citer l'exemple caractéristique du paracétamol, médicament le plus prescrit au monde. Ce médicament disponible en France sans ordonnance est compatible avec une prise chronique, mais il n'est que faiblement efficace contre les douleurs intenses. De plus, sa posologie est limitée par le risque de toxicité hépatique.

Il reste donc beaucoup de progrès à faire dans le domaine de la pharmacologie de la douleur pour disposer de molécules permettant de soulager les patients douloureux chroniques de manière efficace et sans risque. La recherche effectuée sous la direction du Pr Alain Eschalier à l'unité Inserm 766 est orientée dans ce sens et selon deux axes majeurs. Le premier consiste à mieux comprendre le mécanisme d'action des antalgiques de référence afin d'en améliorer l'efficacité ou d'en réduire les effets indésirables. Le second axe de recherche est basé sur l'identification des acteurs moléculaires impliqués dans les dérèglements pathologiques de la nociception, ceci dans le but de progresser dans notre compréhension de la physiopathologie de la douleur mais aussi de disposer de nouvelles cibles pharmacologiques potentielles, spécifiques d'une ou de plusieurs pathologies douloureuses.

Ce travail de thèse s'inscrit dans ce deuxième axe de recherche et a pour objectif de caractériser l'implication de la protéine Nav1.9 dans la douleur, chez l'animal sain et dans deux conditions pathologiques : l'inflammation et la neurotoxicité sensorielle induite par l'oxaliplatine, agent anticancéreux indiqué notamment dans le traitement du cancer du côlon. Nav1.9 est un canal ionique membranaire qui participe à l'activité électrique de certains neurones dédiés à la perception de la

³ L'auto-immunité est souvent en cause lors de pathologies inflammatoires chroniques. C'est le cas notamment de la polyarthrite rhumatoïde ou de la maladie de Crohn (inflammation viscérale).

douleur, les nocicepteurs. Plusieurs données bibliographiques, bien que parfois contradictoires, vont dans le sens d'une régulation du canal Nav1.9 par l'inflammation. Ce travail a pour premier objectif de déterminer *in vivo* le rôle joué par le canal Nav1.9 dans la douleur inflammatoire, qu'elle soit spontanée ou provoquée par des stimuli thermique et mécanique, et sur les modes aigu à chronique. Parallèlement, les aspects moléculaires, cellulaires et fonctionnels de son implication dans ce type de douleurs ont été explorés. La deuxième partie de ce travail découle d'un résultat surprenant obtenu lors d'un test de sensibilité thermique. Au cours de ce test, des souris invalidées pour le gène codant le canal Nav1.9 se sont montrées moins sensibles au froid douloureux ($\leq 5^{\circ}\text{C}$) que leurs congénères non-transgéniques. Suite à ce constat intéressant, nous avons décidé que la contribution du canal Nav1.9 à la sensibilité au froid normale et pathologique ferait l'objet d'un deuxième axe de travail de thèse, notamment grâce un modèle connu pour induire une forte hypersensibilité au froid : la neuropathie chimio-induite par l'oxaliplatine.

Ce manuscrit sera divisé en 3 grandes parties. Tout d'abord une introduction générale permettra de poser les bases de l'anatomie et du fonctionnement du système nociceptif périphérique, en présentant les principaux acteurs moléculaires de ce système et en insistant particulièrement sur les canaux sodiques dépendants du voltage dont fait partie Nav1.9. Dans la seconde partie, les résultats obtenus concernant l'implication du canal Nav1.9 dans la douleur inflammatoire seront exposés et discutés. Enfin, les résultats de l'étude du rôle joué par Nav1.9 dans la perception du froid normale et pathologique seront eux aussi présentés et discutés. Chacune des deux dernières parties sera précédée d'une introduction bibliographique permettant de mieux comprendre ces pathologies et les mécanismes déjà décrits.

II. LE SYSTEME NERVEUX NOCICEPTIF PERIPHERIQUE

La capacité des organismes à ressentir et intégrer leur environnement à travers ses paramètres physico-chimiques est apparue très tôt dans l'évolution (Okamura et al., 2005; Kang et al., 2010). Elle a fait l'objet d'une sélection naturelle constante, permettant l'émergence rapide d'un système sensoriel particulier, dédié à la perception des stimuli potentiellement nocifs⁴.

Le système nociceptif fait partie intégrante du système somesthésique. Il a pour but d'alerter l'individu en cas de danger potentiel, qu'il provienne du monde extérieur (extéroception) ou de l'organisme lui-même (intéroception). Ce système, n'est pas exclusif d'une modalité de stimulation, mais est en mesure de détecter des stimuli de nature thermique (chaleur ou froid extrême), mécanique (piqûre, pincement, pression intense...), ou chimique (venins, irritants, médiateurs de l'inflammation ou de l'ischémie...). Ceci est rendu possible par la grande diversité cellulaire et moléculaire des fibres nerveuses présentes à l'interface entre l'organe ou le tissu soumis à la stimulation et le système nerveux central, siège de l'intégration du message douloureux en termes de localisation, d'intensité, de nature ou des diverses composantes cognitivo-émotionnelles de la douleur.

⁴ Une étude a par exemple permis de dater l'apparition du gène TRPA1, impliqué dans la nociception chez les vertébrés comme chez les invertébrés, à 500 millions d'années. Les bases moléculaires de la nociceptions auraient donc été acquises avant l'apparition des premières plantes et animaux terrestres (Kang et al., 2010)

Introduction et bases bibliographiques

Le système nerveux nociceptif périphérique

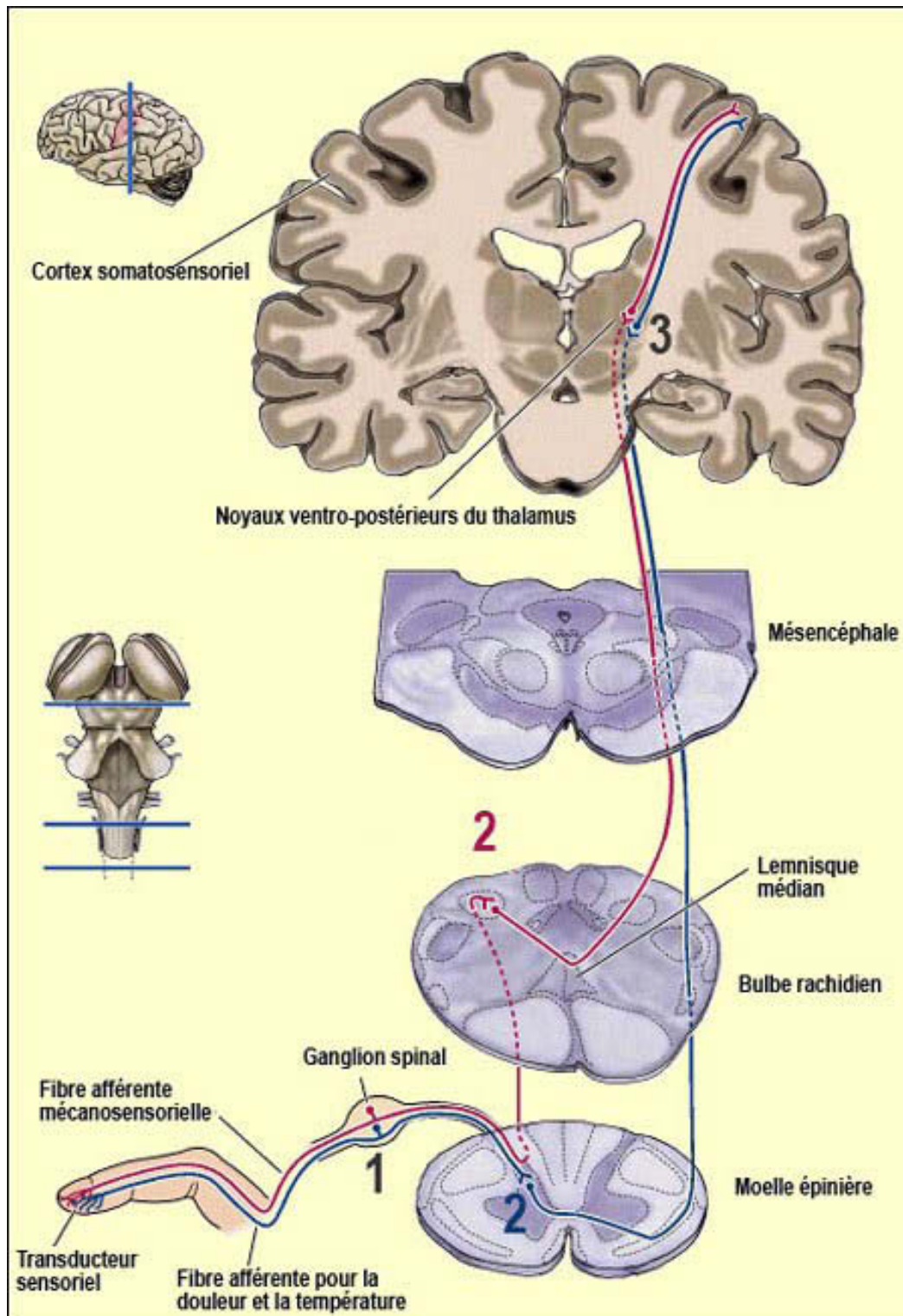


Figure 1. Les voies du tact et de la nociception.

Sur ce schéma figurent les voies du tact (en rouge) et de la nociception (en bleu), depuis la terminaison cutanée jusqu'au cortex somesthésique. Les trois niveaux, correspondant dans chaque cas à un circuit de trois neurones, sont identifiés par les chiffres 1 (fibre afférente primaire), 2 (neurone de second ordre ou spino-thalamique) et 3 (neurone de troisième ordre ou thalamo-cortical). D'après Purves et al., 2003.

Par souci de simplicité, le système nociceptif est souvent divisé en trois grandes parties aux fonctions bien définies :

- **Les fibres afférentes primaires** ou nocicepteurs (n°1 sur la Figure 1) innervent les organes et tissus sensibles à la douleur, incluant la peau, organe majeur de l'interface avec le monde extérieur. Ces fibres, qui représentent la partie périphérique du système nociceptif, peuvent être plus ou moins spécialisées dans la détection d'une modalité de stimulation donnée. Elles vont avoir pour fonction principale de coder l'intensité, l'évolution et la durée du stimulus, avant de transmettre l'information à un neurone de second ordre au sein de la moelle épinière.

- **La moelle épinière** reçoit entre autres les afférences nociceptives périphériques. Elle va conduire les informations jusqu'aux centres nerveux supérieurs (fonction occupée par le neurone de second ordre, n°2 bleu sur la Figure 1), mais a également un rôle important dans la modulation de l'information nociceptive, qu'elle soit antalgique ou pro-algique. Enfin, elle va permettre la génération de mouvements réflexes pour une réponse rapide à la douleur. En ce qui concerne l'innervation de la sphère oro-faciale, toutes ces fonctions sont assurées par le noyau du nerf trijumeau, dont l'organisation cellulaire est comparable à celle de la moelle épinière (voir p. 20).

- **Les centres nerveux supérieurs** et le cerveau permettent l'intégration de l'information douloureuse. C'est à ce niveau que sont élaborées les réponses physiologiques (tachycardie, vasoconstriction, mydriase, augmentation du métabolisme...) et psychologiques (stress, anxiété, aversion...) à la douleur. La douleur va également être qualifiée en termes de nature, d'intensité et de localisation au niveau des cortex somesthésiques (voir le neurone thalamo-cortical, n°3 sur la Figure 1).

Le système nerveux nociceptif va être décrit dans les chapitres suivants en tant que partie intégrante du système somatosensoriel, avec une insistance particulière sur la composante périphérique qui est au cœur de ce travail de thèse.

1. ANATOMIE

Le système nerveux nociceptif périphérique est à l'interface entre le système nerveux central, lieu de l'intégration et de la modulation de la douleur, et les organes et tissus sensibles. On oppose classiquement l'innervation rachidienne à l'innervation crânienne à cause des différences anatomiques existantes entre ces deux niveaux. Si ces différences sont importantes au niveau anatomique, l'organisation cellulaire et fonctionnelle du système nociceptif périphérique suit le même schéma dans les deux cas.

1.1. L'innervation rachidienne

Le système somesthésique périphérique, qu'il soit rachidien ou crânien, est constitué d'un réseau de fibres nerveuses à la morphologie unique. En effet, ces fibres dites "afférentes primaires" (FAP), ou nocicepteurs dans le cas du système nociceptif⁵, sont pseudo-unipolaires : elles n'émettent qu'une seule projection de nature axonale qui se divise rapidement en deux branches. La première branche, qui est aussi la plus longue, intègre les nerfs périphériques innervant les tissus. La branche courte intègre les racines dorsales de la moelle épinière, uniquement composée d'afférences sensibles (nociceptives ou non), et projette au niveau de la corne dorsale (voir Figure 2). Les racines ventrales de la moelle épinière sont quant à elles composées de fibres motrices dont les corps cellulaires se trouvent au niveau des cornes ventrales. La quasi-totalité des nerfs rachidiens sont des nerfs mixtes⁶, issus de la fusion des racines dorsales et ventrales. Ils sont donc composés à la fois de fibres afférentes sensibles et de fibres efférentes motrices, auxquelles peuvent également s'ajouter des fibres efférentes végétatives sympathiques ou parasympathiques.

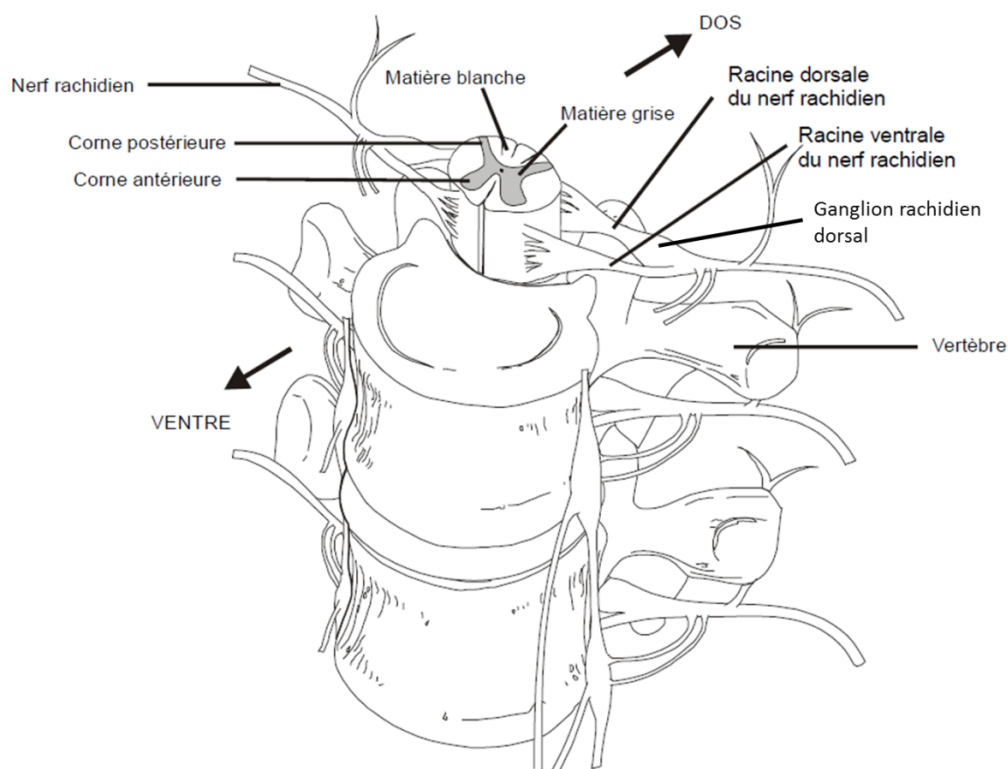


Figure 2. Innervation de la moelle épinière par les FAP et structuration des nerfs périphériques.

Source : Université de Laval (Canada), cours de Gilles Bourbonnais

⁵ Les nocicepteurs sont une classe de FAP, mais il en existe d'autres types, dédiés à la perception de différentes modalités de stimulation non douloureuses. Voir "Diversité fonctionnelle des fibres afférentes", page 21.

⁶ Le nerf C1 ne possède pas de racine dorsale car purement moteur. Concernant les autres nerfs, la proportion afférences/efférences peut varier considérablement de l'un à l'autre en fonction des territoires innervés.

Introduction et bases bibliographiques

Le système nerveux nociceptif périphérique

Les corps cellulaires des FAP rachidiennes sont regroupés au sein des ganglions rachidiens dorsaux (ou DRG pour "Dorsal Root Ganglion"), situés de part et d'autre de la moelle épinière (voir Figure 2). Chez l'Homme, on compte 29 paires de DRG et 31 paires de nerfs rachidiens⁷, dont le nom est fonction de la vertèbre dont ils sont issus :

- 8 nerfs cervicaux (notés C1 à C8)
- 12 nerfs thoraciques (notés T1 à T12)
- 5 nerfs lombaires (notés L1 à L5)
- 5 nerfs sacrés (notés S1 à S5)
- 1 nerf coccygien vestigial (noté Co)

Ces nerfs vont innover les différents organes selon un plan bien défini, comme l'illustre l'innervation cutanée (voir Figure 3). On peut en effet représenter à la surface du corps les territoires d'innervation des nerfs rachidiens, ou dermatomes, de manière plus ou moins précise. Il faut signaler par ailleurs que les territoires d'innervation des nerfs périphériques ne chevauchent pas forcément les territoires d'innervation des racines dorsales, car des réarrangements (anastomose) ont lieu au sein des différents plexus existants de part et d'autre de la colonne vertébrale.

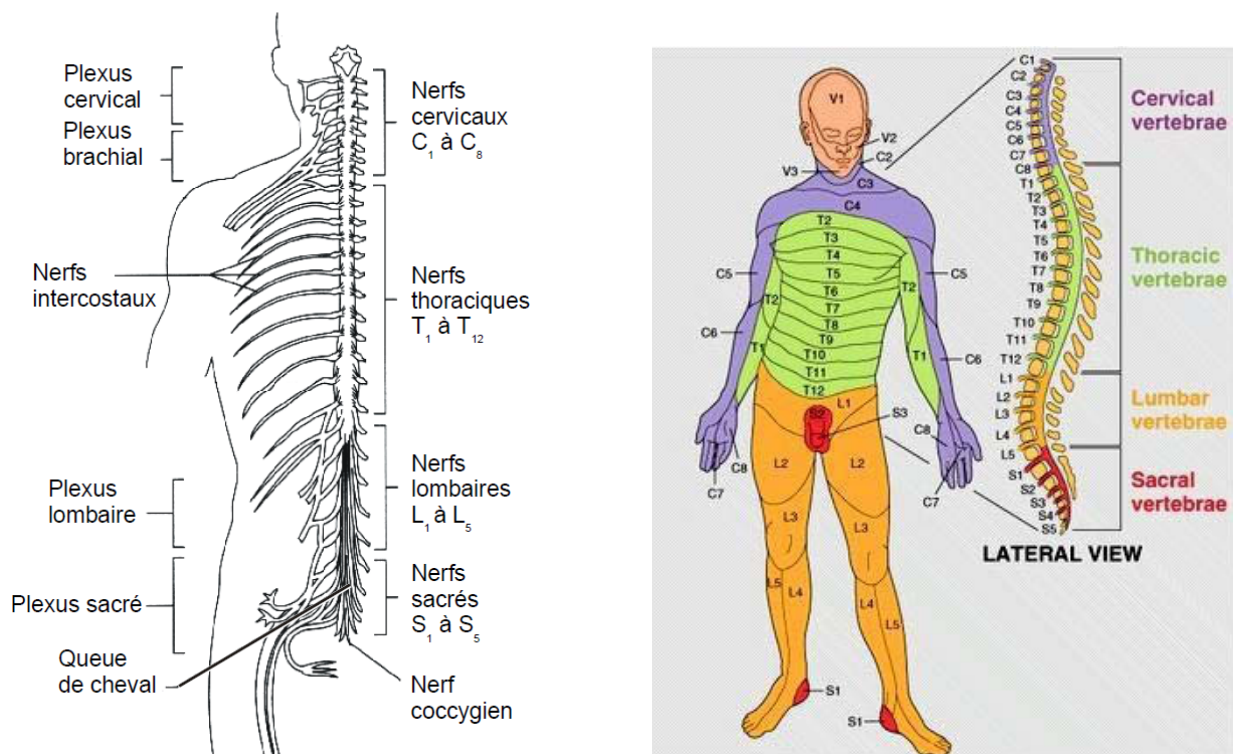


Figure 3. Les nerfs rachidiens et leurs territoires d'innervation cutanée.

Sur la figure de gauche sont représentés les 31 paires de nerfs rachidiens ainsi que les plexus nerveux qu'ils forment. Sur la figure de droite sont représentés les dermatomes correspondant, c'est-à-dire les territoires d'innervation cutanée de ces différents nerfs. Sources : Université de Laval (Canada), cours de Gilles Bourbonnais ; <http://www.sci-recovery.org>

⁷ La différence entre le nombre de DRG et le nombre de nerfs s'explique par le fait que le nerf C1 ne possède pas de racine dorsale (nerf moteur pur) et que le nerf coccygien possède un ganglion intradural.

1.2. L'innervation crânienne

Douze nerfs crâniens, notés de I à XII, contribuent à l'innervation de la sphère oro-faciale. Ils ont pour point commun de projeter une branche axonale au niveau du tronc cérébral. Les nerfs crâniens peuvent être sensitifs, moteurs ou mixtes, mais la composante sensitive de tous ces nerfs, sauf un, ne va pas être dédiée à la somesthésie, mais à une autre modalité sensorielle comme la vision, l'audition, la gustation ou l'olfaction. La totalité de l'innervation somesthésique oro-faciale est en fait assurée par les 3 branches d'un seul et même nerf, le nerf V, ou nerf trijumeau, dont les FAP prennent naissance au niveau du ganglion de Gasser ou ganglion trigéminal (ou TG pour "Trigeminal Ganglion"), équivalent du DRG spinal). Celles-ci se projettent ensuite dans le noyau du nerf trijumeau, qui assure une fonction similaire à celle de la moelle épinière, au niveau de la face (voir Figure 4).

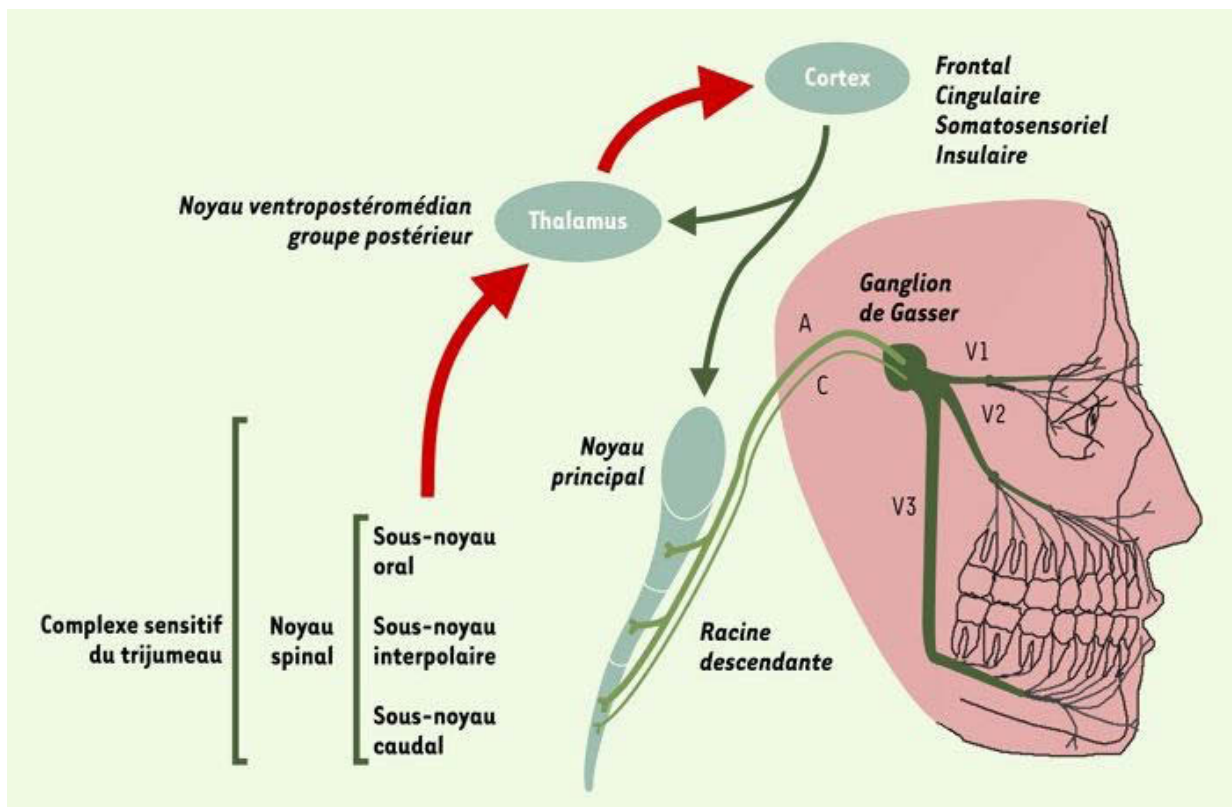


Figure 4. Innervation somesthésique de la face.

Sur ce schéma figure l'innervation somesthésique périphérique de la face, à savoir le ganglion de Gasser (ou ganglion trigéminal) et les trois branches de la cinquième paire de nerfs crâniens à qui il donne naissance (V1: nerf ophtalmique; V2: nerf maxillaire; V3: nerf mandibulaire). Les FAP de ce ganglion font synapse avec un neurone de second ordre au niveau du noyau du nerf trijumeau. (Dallel et al., 2003)

2. DIVERSITE FONCTIONNELLE DES FIBRES AFFERENTES PRIMAIRES

On peut distinguer les FAP selon plusieurs critères anatomiques (diamètre, présence ou non d'une gaine de myéline), fonctionnels (vitesse de conduction, modalité ou seuil d'activation), ou encore par l'expression de divers marqueurs moléculaires. La classification la plus couramment utilisée est basée sur la vitesse de conduction des fibres, dont dépend la plupart des autres paramètres. C'est la classification d'Erlanger-Gasser, basée sur des enregistrements de nerfs de grenouilles réalisés *in vitro* pendant les années 20 (Gasser et Hartree, 1924). Les auteurs ont constaté que suite à une stimulation électrique de l'extrémité d'un nerf, plusieurs pics sont enregistrées en décalé à l'autre extrémité (notés α , β , γ et δ , voir Figure 5C). Herbert S. Gasser et Joseph Erlanger ont pu plus tard faire le lien entre ces différents pics et les vitesses de conduction respectives des fibres qui composent le nerf grâce aux premiers enregistrements de fibres isolées (Gasser, 1941), ce qui leur a valu le prix Nobel de médecine en 1944. La classification a été ensuite revue pour former 3 groupes de fibres, A, B et C, ainsi que les subdivisions du premier groupe ($A\alpha$, $A\beta$, $A\gamma$, $A\delta$, B et C, voir Tableau 1).

Type de fibre	Diamètre (μm)	Gaine de myéline	Vitesse de conduction (m.s^{-1})	Fonction des fibres <u>afférentes</u>
Aα	12 - 20	oui	80 - 120	- Proprioception (fuseaux neuromusculaires de type Ia, organe tendineux de Golgi)
Aβ	6 - 12	oui	35 - 75	- Tact - Proprioception (fuseaux neuromusculaires de type II, récepteurs articulaires)
Aδ	1 - 5	oui (légère)	4 - 30	- Nociception - Température non nocive
C	0,2 - 1,5	aucune	0,4 - 2	- Nociception - Prurit - Température non nocive - Toucher plaisant

Tableau 1. Caractéristiques et fonctions des différents types de fibres afférentes primaires.

NB : les fibres purement efférentes, de type $A\gamma$ et B, sont volontairement omises. D'après Guirimand et Le Bars, 1996; McGlone et Reilly, 2010; Schepers et Ringkamp, 2010.

Seules les fibres $A\delta$ et C véhiculent des informations nociceptives, de manière non exclusive. Les fibres $A\beta$ sont spécialisées dans les afférences tactiles (toucher non douloureux) et proprioceptives. Les fibres $A\alpha$, majoritairement efférentes et motrices, contribuent également au système proprioceptif, renseignant l'organisme sur l'état de contraction de ses muscles. Il existe encore des

Introduction et bases bibliographiques

Le système nerveux nociceptif périphérique

fibres A γ , toutes efférentes. Celles-ci interviennent dans la contraction du fuseau neuromusculaire (système proprioceptif). Les fibres du groupe B sont elles aussi efférentes et constituent les fibres pré-ganglionnaires du système nerveux autonome.

Sur le plan nociceptif, les propriétés respectives des fibres A δ et C se traduisent par des douleurs perçues différentes, dans l'espace et dans le temps (voir Figure 5A-B). Les fibres A δ véhiculent le message relativement rapidement (4 à 30 m.s⁻¹) et sont responsables d'une douleur aiguë quasi-immédiate et bien localisée. Les fibres C transmettent un message retardé (à la vitesse de 0,4 à 2 m.s⁻¹) et vont générer une douleur diffuse, plus prolongée. Les fibres C représentent 80% de l'innervation cutanée, et presque la totalité de l'innervation viscérale (Guirimand et Le Bars, 1996).

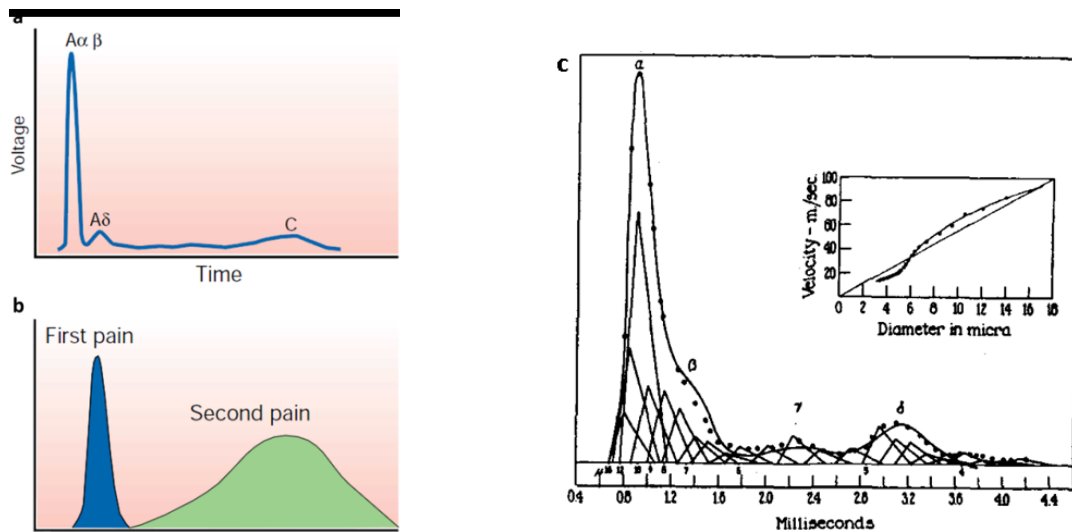


Figure 5. Impact de la vitesse de conduction des FAP sur la nociception.

a) Enregistrement schématique d'un potentiel d'action (PA) complexe, résultant de la somme des PA enregistrés à l'extrémité d'un nerf en réponse à la stimulation de l'autre extrémité de ce dernier. On peut voir 3 pics décalés (A α/β , A δ et C) traduisant les différentes vitesses de conduction des fibres qui le composent. **b)** Le décalage entre les pics A δ et C se traduit par une douleur immédiate (A δ) suivie d'une douleur tardive et plus diffuse (C). **c)** Illustration originale d'un enregistrement réalisé sur une section de nerf saphène de chat de 6 cm par Herbert S. Gasser. On peut noter que l'ancienne classification est utilisée. (Gasser, 1941; Julius et Basbaum, 2001)

Les FAP peuvent également être divisées sur le plan fonctionnel en différents groupes, chacun responsable d'une des composantes de la somesthésie (toucher, perception thermique, proprioception, nociception). Ces fibres peuvent en effet être spécialisées dans la détection d'une modalité et/ou d'une intensité de stimulation donnée. On distingue les 4 grands types de récepteurs somesthésiques suivants :

- **les mécanorécepteurs cutanés**, responsables de toutes les composantes du toucher comme la pression, le déplacement, la texture, la taille de l'objet...
- **les mécanorécepteurs proprioceptifs**, ou propriocepteurs, qui ont pour fonction de renseigner l'organisme de façon statique et dynamique sur l'état de contraction des muscles ou d'étirement des tendons, ainsi que sur la position des articulations

- **les thermorécepteurs**, permettant de ressentir finement la température dans une gamme dite "de confort"
- **les nocicepteurs**, qui vont être responsable de la détection des stimuli potentiellement nocifs, qu'ils soient de nature physique (chaud, froid, écrasement, étirement...) ou chimique (irritation, inflammation...)

Dans la partie qui va suivre, et qui a pour but de décrire ces différents types de FAP, les fibres à bas seuil seront différenciées des fibres à haut seuil d'activation que sont les nocicepteurs. En effet, ces FAP à haut seuil d'activation (*i.e.* activables par des stimuli de très forte intensité, nocifs) forment une famille hétérogène et complexe.

2.1. Fibres à bas seuil d'activation

Ces fibres sont dédiées à la perception du toucher discriminant ou de la température non nocive, ainsi qu'à la proprioception. Selon leur fonction, on les nomme proprio-, mécano- ou thermorécepteurs, les deux derniers projetant essentiellement au niveau cutané.

2.1.1. Mécanorécepteurs tactiles cutanés

Ces récepteurs, également appelés mécanorécepteurs à bas seuil ou LTM pour "low threshold mechanoreceptors" sont au nombre de 4 (corpuscule de Pacini, corpuscule de Meissner, disque de Merkel, corpuscule de Ruffini), fortement concentrés dans la peau glabre, auxquels il faut ajouter les récepteurs des follicules pileux sur le reste du corps (voir Figure 6, Figure 7).

Introduction et bases bibliographiques

Le système nerveux nociceptif périphérique

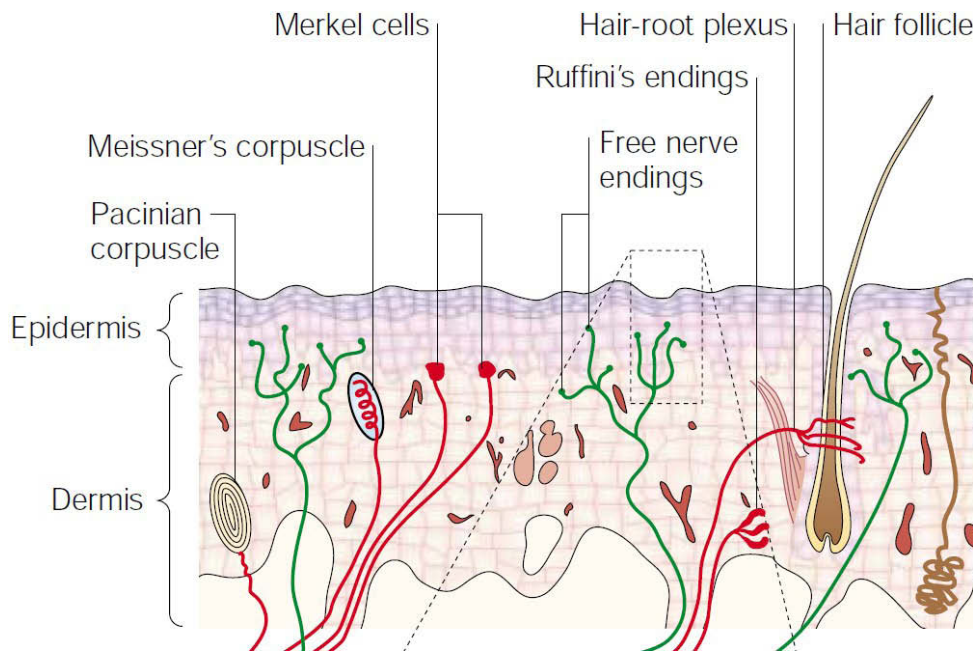


Figure 6. Vision schématique d'une coupe de peau, illustrant les différents récepteurs sensoriels, leur morphologie, et leurs positions respectives.

Les terminaisons nerveuses libres représentées sont des nocicepteurs ou des thermorécepteurs à bas seuil, décrits plus loin dans ce manuscrit (Patapoutian et al., 2003).

On distingue les récepteurs tactiles cutanés selon 2 critères majeurs :

- Leur **champ récepteur**. Les récepteurs situés dans les couches profondes du derme sont pourvus d'un champ récepteur large (corpuscules de Pacini et de Ruffini). Ils interviennent dans la perception du déplacement des stimuli mécaniques. Les disques de Merkel et les corpuscules de Meissner sont situés à la limite derme/épiderme et ont par conséquent un champ récepteur réduit. Ils sont quant à eux impliqués dans le toucher discriminant (formes et textures).
- Leur **vitesse d'adaptation**. Les mécanorécepteurs à adaptation rapide (corpuscules de Pacini et de Meissner) déchargent lors des changements d'état (en début et fin d'une stimulation, réponse tonique). La fréquence des potentiels d'action (PA) va coder la vitesse de changement d'état. Les récepteurs à adaptation lente (disques de Merkel et corpuscules de Ruffini) vont émettre des PA tant qu'ils ne se trouvent pas à leur état de repos (toute la durée de stimulation, réponse phasique). Ils vont coder l'intensité et la durée de stimulation. Les mécanorécepteurs cutanés sont ainsi souvent différenciés par ce seul paramètre (FAI et FAII pour "fast adapting" I et II, SAI et SAII pour "slow adapting" I et II). La peau (glabre ou pileuse) compte 5 fois plus de récepteurs à adaptation rapide qu'à adaptation lente.


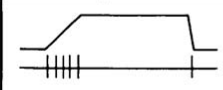
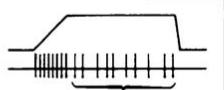

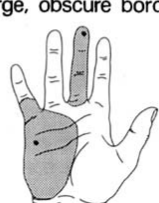
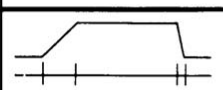


		ADAPTATION			
		Fast, no static response	Slow, static response present		
RECEPTIVE FIELDS	Small, sharp borders 	 Edge sensitive FAI (43%) Meissner	 Irregular Edge sensitive SAI (25%) Merkel		INNERVATION DENSITY
	Large, obscure borders 	 FAII (13%) Pacini Golgi-Mazzoni	 Regular Sensitive to lateral skin stretch SAII (19%) Ruffini		

Figure 7. Les quatre types de mécanorécepteurs à bas seuil de la peau glabre.

Au centre sont présentés les quatre mécanorécepteurs de la peau glabre et leurs réponses électrogéniques à une même stimulation. A gauche sont illustrés les champs récepteurs et à droite la densité d'innervation au niveau de l'intérieur des mains. Les mécanorécepteurs sont partagés en deux colonnes, selon que leur adaptation est lente (SA pour "slow adapting") ou rapide (FA pour "fast adapting") (McGlone et Reilly, 2010).

Tous ces récepteurs sont à innervation A β . Il existe cependant des exceptions pour les récepteurs des follicules pileux, pouvant être couplés à des fibres A δ (fibres "D-hair", Koltzenburg et al., 1997) mais aussi à des fibres C. L'activation des fibres C tactiles ne serait cependant pas sensori-discriminative, mais impliquée dans la réponse émotionnelle et hormonale aux caresses (Olausson et al., 2002).

2.1.2. Propriocepteurs

Cette classe particulière de mécanorécepteurs intervient dans la sensibilité proprioceptive, c'est-à-dire du mouvement et de la position des membres. Ils sont connectés à des fibres de gros calibre et à conduction rapide A α et A β . Il en existe 3 types :

- **Les fuseaux neuromusculaires.** Ces récepteurs sont sensibles aux variations d'étirement du muscle. Ils sont situés à l'intérieur de ce dernier, parallèlement aux fibres musculaires, et sont constitués d'un regroupement de 5 à 15 fibres musculaires protégées par une enveloppe de tissu conjonctif. La position des noyaux des fibres permet de différencier 2 types de fuseaux neuromusculaires :
 - Les fuseaux neuromusculaires primaires (à sac nucléaire) sont innervés par des fibres de type Ia (A α) et sont sollicités principalement lors des changements d'états de contraction musculaire (réponse à dominante tonique).
 - Les fuseaux neuromusculaires secondaires (à chaîne nucléaire) sont innervés par des fibres de type II (A β) et ne codent que pour l'état de contraction du muscle (réponse phasique).

Ces propriocepteurs sont également impliqués dans le réflexe myotatique, contraction involontaire d'un muscle en réponse à son étirement.

- **Les organes tendineux de Golgi.** Situés à l'interface muscle-tendon, ces récepteurs sont constitués de fibres de collagène connectées aux fibres musculaires d'un côté et à l'aponévrose tendineuse de l'autre. Ces récepteurs, innervés par des fibres de type Ib (A α) sont sensibles aux variations de la tension musculaire, directement proportionnelle à la force développée.
- **Les récepteurs articulaires.** Localisés dans le tissu conjonctif des articulations, ces récepteurs permettent un codage de l'angle de flexion ou d'extension de l'articulation, ainsi que de sa vitesse de variation. Ils ont donc une réponse à la fois tonique et phasique. Ce sont principalement des récepteurs de Ruffini (pour les capsules articulaires), mais aussi des récepteurs de Golgi (pour les ligaments articulaires).

2.1.3. Thermorécepteurs

Ces récepteurs sont spécialisés dans la perception fine de la température non nocive, c'est à dire dans une gamme allant conventionnellement de 20 à 45°C⁸ (Schepers et Ringkamp, 2010). Selon leur type, ils vont répondre soit à une augmentation de température (thermorécepteurs au chaud),

⁸ Au-delà de ces températures, les thermorécepteurs peuvent être toujours actifs, mais l'activation parallèle des fibres nociceptives prend le dessus.

soit à une diminution de celle-ci (thermorécepteurs au froid, voir Figure 8). Ils sont constitués de fibres nerveuses de type A δ ou C aux terminaisons libres et peuvent être cutanés ou internes, intervenant alors dans les processus thermorégulatifs. Ces fibres thermoréceptrices diffusent peu sous la surface cutanée avant d'émettre des projections épidermiques, ce qui leur vaut des champs récepteurs ponctuels non chevauchants (de un à quelques millimètres de diamètre). La densité de récepteurs peut en revanche varier fortement en fonction du territoire considéré. Ainsi, les lèvres comptent environ 20 récepteurs au froid par centimètre carré contre 4 sur la peau des doigts (McGlone 2010).

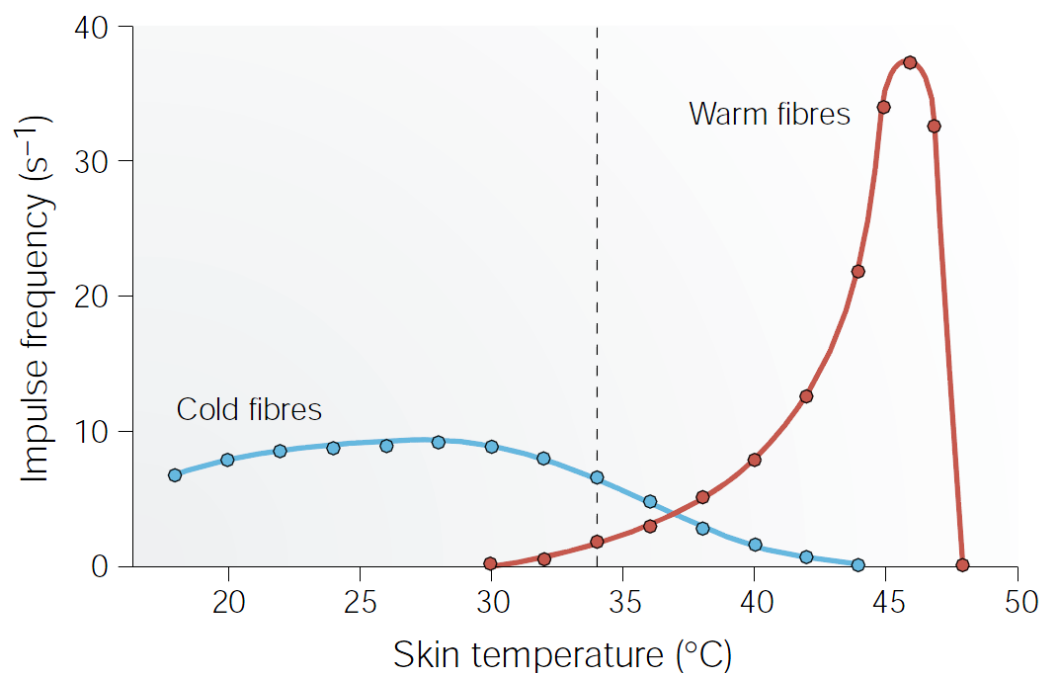


Figure 8. Fréquence moyenne de décharge des thermorécepteurs au froid et au chaud en fonction de la température.
La ligne pointillée indique la température normale de la peau (33°C), à laquelle les récepteurs au froid sont plus actifs que les récepteurs au chaud (Patapoutian et al., 2003).

2.1.3.1. Thermorécepteurs au froid

Ces récepteurs sont des fibres de type A δ répondant à une large gamme de température comprise entre 17 et 40°C, avec un pic d'activité situé entre 20 et 30°C (Dubner et al., 1975). Les thermorécepteurs au froid sont activés à la température normale de la peau. Leur réponse est à la fois tonique et phasique. Ils vont tout d'abord répondre vigoureusement à une baisse de température (réponse tonique) puis se stabiliser à un niveau d'activité correspondant à la température atteinte (réponse phasique). L'augmentation de la température va quant à elle avoir un effet inhibiteur sur leur activité. Ces fibres ont pour point commun d'être activées par le menthol.

Il existe d'autres types de fibres activées par le froid non nociceptif. Nommés Récepteurs au Froid à Haut seuil (HCR pour "High threshold Cold Receptors"), ces fibres de type C sont activées à des températures inférieures à 27°C (pas d'activité lorsque la température est neutre), et ne répondent

Introduction et bases bibliographiques

Le système nerveux nociceptif périphérique

pas aux stimulations mécaniques (LaMotte et Thalhammer, 1982). Leur réponse n'est que transitoire et nécessite un refroidissement rapide, supérieur à 2°C/s. Le rôle des fibres C dans la perception du froid non nocif est pour l'instant inconnu, mais une équipe a proposé que ces fibres, également activées par le chaud, puissent être impliquées dans certains phénomènes d'hypersensibilité au froid ou dans la sensation paradoxale de brûlure provoquée par un refroidissement rapide.

Environ la moitié des mécanorécepteurs à bas seuil et à adaptation lente (*i.e.* les fibres SA I et II : disques de Merkel et corpuscules de Ruffini) répondent également à un refroidissement de la peau à 14,5°C (Cahusac et Noyce, 2007). Dans ce cas encore, la contribution de ces fibres à la sensibilité au froid est considérée comme peu probable, de par leur nature A β , mais aussi car l'amplitude de leur réponse est négligeable par rapport à ce qui suit une stimulation mécanique, ou encore à ce que l'on peut observer dans les thermorécepteurs A δ .

2.1.3.2. Thermorécepteurs au chaud

Les thermorécepteurs au chaud sont des fibres C qui, comme les thermorécepteurs au froid, possèdent un champ récepteur réduit voir ponctuel. Ils ne répondent qu'aux stimulations thermiques de 30 à 50°C, avec un maximum d'activité autour de 40-43°C (Darian-Smith et al., 1979; Schepers et Ringkamp, 2010). Ils chevauchent donc la gamme d'activation des thermorécepteurs au froid et sont eux aussi actifs à la température cutanée normale, mais dans une moindre mesure que ces derniers. Suite à un réchauffement, l'activité électrique de ces fibres va être importante (forte réponse tonique) puis se stabiliser au plateau correspondant à la température environnante (réponse phasique). Ces fibres sont donc elles aussi capables de coder une température stable mais vont réagir de façon plus intense aux variations de température que les fibres sensibles au froid, favorisant la discrimination thermique. Le refroidissement quant à lui va inhiber leur activité, alors que le menthol n'a aucun effet.

2.2. Nocicepteurs

Si le concept de neurones sensoriels dédiés à la perception douloureuse est assez ancien (Sherrington, 1906), les premières preuves expérimentales de l'existence de neurones ne répondant qu'aux stimulations douloureuses sont relativement récentes (Burgess et Perl, 1967). Depuis lors, les techniques électrophysiologiques, pharmacologiques et moléculaires ont permis de caractériser les nocicepteurs et de mettre en évidence leur diversité.

Les nocicepteurs sont des fibres afférentes primaires à haut seuil d'activation, activées par des stimulations mécaniques, thermiques et/ou chimiques dont la forte intensité ou la nature traduit un

danger potentiel pour l'organisme. Ce sont des fibres de petit calibre A δ ou C⁹ munies de terminaisons libres à leurs extrémités. Si les électrophysiologistes et les biologistes moléculaires sont parvenus à caractériser différentes populations de nocicepteurs en fonction de leurs propriétés électrogéniques ou de l'expression de certains marqueurs, ces fibres forment en réalité un ensemble extrêmement hétérogène, chaque nocicepteur étant le produit d'une combinatoire développementale très complexe. Les populations neuronales identifiées ne constituent que des tendances dominantes observées au sein des nocicepteurs, mais en aucun cas des groupes cloisonnés (Belmonte et Viana, 2008). De nombreux critères de différenciation peuvent être utilisés pour distinguer des groupes de nocicepteurs, comme la nature des stimuli détectés (mécanonocicepteur, thermonocicepteur, nocicepteur polymodal) ou la présence de divers marqueurs moléculaires (récepteurs de facteurs de croissance, neuropeptides, canaux ioniques...). Dans cette introduction, les nocicepteurs seront en premier lieu différenciés selon leur calibre. En effet, ce paramètre va influencer considérablement sur leur rôles respectifs dans la perception douloureuse. De par leur vitesse de conduction plus importante, les fibres A δ sont responsables d'une douleur "immédiate", alors que les fibres C sont à l'origine d'une douleur plus tardive, mais également plus diffuse (pour rappel voir Figure 5 page 22).

2.2.1. Fibres A δ nociceptives

Les nocicepteurs A δ (et potentiellement A β ⁹) apportent au système nerveux central une information rapide et précise sur la nature et la localisation de la douleur. En fonction de leurs réponses à des stimuli mécaniques et thermiques, ils ont été divisés en 3 groupes :

Les fibres AMH (pour "A-fiber Mecano-Heat sensitive"), polymodales, répondent à la fois aux stimulations mécaniques et aux stimulations thermiques chaudes. Elles vont également pouvoir être activées par différents ligands chimiques endogènes ou exogènes. On distingue les **fibres AMH de type I**, répondant préférentiellement aux stimulations mécaniques (seuil thermique très élevé, >53°C pour une stimulation courte d'une seconde), et les **fibres AMH de type II**, répondant préférentiellement aux élévations de température (seuil thermique \approx 47°C pour une stimulation courte, Treede et al., 1998). Les fibres de type II ne sont pas retrouvées dans la peau glabre, ceci pouvant expliquer l'absence de douleur thermique rapide pour une stimulation douloureuse d'intensité modérée (<53°C). Ces fibres polymodales AMH représentent ensemble 86% des nocicepteurs de type A (Djoughri et Lawson, 2004).

⁹ Il existe également, en plus faible quantité, des nocicepteurs de type A β (18% des nocicepteurs de type A chez le rat). Seule la vitesse de conduction permet de différencier les nocicepteurs A δ . Les nocicepteurs de type A forment en effet une population homogène de fibres dont les propriétés recouvrent les caractéristiques A δ jusqu'à la limite basse A β (Djoughri et Lawson, 2004).

Introduction et bases bibliographiques

Le système nerveux nociceptif périphérique

Le faible pourcentage de nocicepteurs de type A non polymodaux va se partager entre deux populations : les fibres HTM pour "High Threshold Mecanoreceptor", ne répondant qu'aux stimulations mécaniques, et les fibres AMC (pour "A-fiber Mecano-Cold sensitive) activées par la pression et le froid douloureux (<0°C, Simone & Kajander, 1997). Il faut noter qu'à des températures extrêmes (<-12 à -18°C), tous les nocicepteurs sont activés.

2.2.2. *Fibres C nociceptives*

S'il existe des nocicepteurs de type C dédiés à la perception de stimuli thermiques (chaud ou froid) ou mécaniques, la plupart sont polymodaux, comme les nocicepteurs de type A (voir Figure 9). On appelle aussi ces fibres CMH pour "C-fiber Mecano-Heat sensitive", la sensibilité chimique étant là encore implicite, bien que faible par rapport aux fibres A δ (considérant l'effet d'une soupe inflammatoire) ou aux fibres C insensibles aux stimuli mécaniques¹⁰ (Davis et al., 1993).

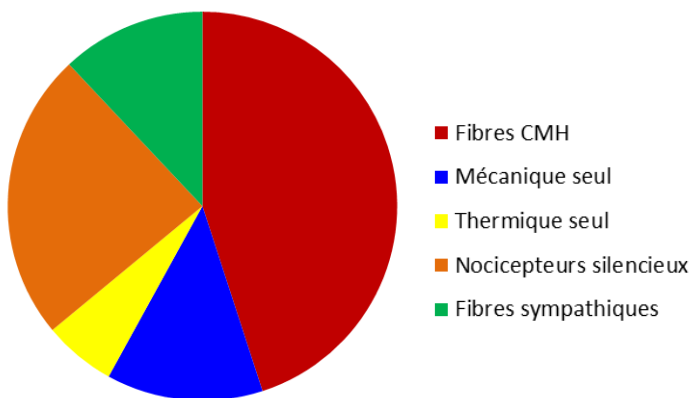


Figure 9. Répartition des fibres C enregistrées au niveau de la peau humaine.

194 fibres C cutanées ont été identifiées au niveau du genou et de la cheville de volontaires sains grâce à des stimulations électriques, de manière à recruter tous les types de fibres, indépendamment de leur modalité d'activation. Une fois le champ récepteur de chaque fibre identifié, différentes modalités de stimulation sont appliquées et les réponses sont enregistrées au niveau du nerf (Schmidt et al., 1995).

Le seuil d'activation des fibres CMH par le chaud a été mesuré aux environs de 40°C en fonction de la profondeur de leurs terminaisons cutanées, comprise entre 20 et 570 μ m chez le singe (Tillman et al., 1995). Un phénomène d'épuisement rapide a été mis en évidence dans ces fibres, diminuant leur réponse lors d'une deuxième stimulation thermique espacée de moins de dix minutes de la première. Ce phénomène a également lieu si les deux stimulations sont de natures différentes (électrique, mécanique ou thermique), mais la récupération est plus rapide (Peng et al., 2003). La sensibilité thermique chaude des fibres C est en très grande partie imputée à TRPV1, dont l'expression est quasiment restreinte aux fibres C, polymodales ou non (Kobayashi et al., 2005). La sensibilité chimique quant à elle est beaucoup plus forte chez les fibres C insensibles à la pression mécanique, qui sembleraient être des chémosenseurs spécialisés. Certaines fibres C vont également se spécialiser dans la réponse chimique aux agents pruritogènes endogènes, comme l'histamine (Schmelz et al.,

¹⁰ Ces fibres ne sont pas réellement "insensibles" aux stimuli mécaniques, mais leur seuil d'activation est considérablement élevé (>6 bar ou 60 g/mm, Meyer et al., 2008).

1997). Ces fibres à conduction très lente (comparée aux fibres CMH) seraient responsables de la sensation de démangeaison et emprunteraient un circuit qui leur serait propre, y compris au niveau des projections central (Schmelz, 2001).

Il existe enfin une population de nocicepteurs dits silencieux, ne répondant ni aux stimuli thermiques, ni aux stimuli mécaniques (Lynn, 1991). Il est cependant possible de "réveiller" ces fibres par différents algogènes comme la capsaïcine (agoniste TRPV1 extrait du piment) ou l'huile de moutarde (agoniste TRPA1). Il a été proposé que ces fibres puissent participer à l'hyperalgie primaire dans certains cas, comme lors d'une réaction inflammatoire (Schmidt et al., 1995).

Sur le plan moléculaire, on distingue aussi deux sous-populations de fibres C par les marqueurs qu'elles expriment, comme certains neuropeptides ou le récepteur à la neurotrophine dont dépend leur survie ou leur maintien. Les sites de projection des nocicepteurs de type C au niveau des cornes dorsales de la moelle épinière vont également être différents (Snider et McMahon, 1998) :

- Les fibres C peptidergiques : Ces fibres sécrètent en particulier deux neuropeptides, la **substance P** et le Peptide Relié au Gène Calcitonine (**CGRP** pour "Calcitonin-Gené Related Peptide"), que l'on retrouve très largement colocalisés. Ils sont exprimés par 50% des nocicepteurs cutanés de type C (et par 20% des fibres A δ , ou 40% des neurones des DRG confondus, Djouhri & Lawson, 2004). En revanche, la quasi-totalité des afférences viscérales ou de la peau glabre sont peptidergiques. Si la très grande majorité des fibres peptidergiques sont des nocicepteurs, la moitié des nocicepteurs est constituée de fibres peptidergiques (Lawson et al., 2002). Ces fibres maintiennent aussi l'expression développementale du récepteur **TrkA** au Facteur de Croissance des Nerfs (NGF pour "Nerve Growth Factor") à l'âge adulte. Ce dernier constitue un marqueur très spécifique des nocicepteurs. Les projections médullaires des fibres C peptidergiques se font essentiellement au niveau des couches I et II externe (voir chapitre 3 p. 33).
- Les fibres C non-peptidergiques : Le principal marqueur moléculaire utilisé pour différencier ces fibres est leur affinité pour l'isolectine B4 (**IB4**), extrait de la plante *Griffonia simplicifolia*, médiée par les résidus α -D-galactose des glucoconjugués membranaires. L'IB4 n'est jamais colocalisée avec le CGRP ou avec la substance P, et toutes les fibres IB4-positives sont nociceptives (Gerke et Plenderleith, 2001). Après la naissance, les fibres C non-peptidergiques perdent leur dépendance au NGF (Molliver et al., 1997) et expriment un proto-oncogène codant pour le récepteur **RET** (pour "Rearranged during Transfection") au Facteur Neurotrophique Dérivé des Gliocytes (GDNF pour "Glial cell line Derived Neurotrophic Factor") ainsi qu'à la neurturine, à l'artémine et à la perséphine, qui sont 3 neurotrophines de la famille du GDNF. Leurs projections médullaires se font principalement au niveau de la couche II interne.

Introduction et bases bibliographiques

Le système nerveux nociceptif périphérique

Ces deux populations de fibres vont également exprimer différemment certains récepteurs ou canaux (voir Figure 10). Ainsi, le récepteur P2X₃ à l'Adénosine Triphosphate (ATP), libérée en cas de lésion tissulaire, est exprimé sélectivement par les neurones IB4-positifs chez le rat (Guo et al., 1999). Le récepteur TRPV1, activé par la chaleur, l'acidité ou les composés vanilloïdes, est exprimé presque exclusivement par les neurones IB4-négatifs chez la souris (Zwick et al., 2002). Ces derniers sont en conséquence plus sensibles à une diminution de pH et à l'application de capsaïcine (Dirajlal et al., 2003). En revanche, ce cloisonnement n'est pas retrouvé chez le rat. (Woodbury et al., 2004). Les marqueurs moléculaires des nocicepteurs sont à l'image des populations neuronales qu'ils définissent : leur combinatoire est complexe. On ne peut en dégager que des tendances, et non des règles absolues.

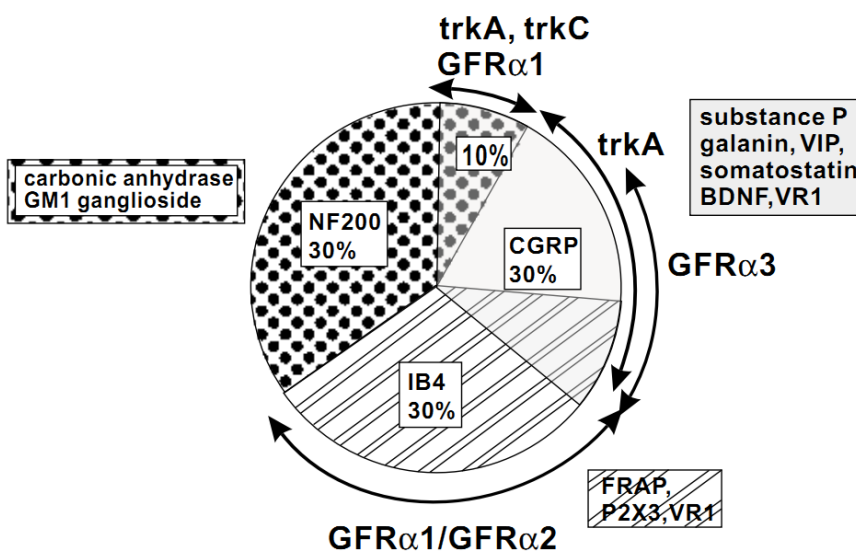


Figure 10. Les principaux marqueurs cellulaires des neurones des DRG chez le rat.

Le premier niveau de distinction concerne les marqueurs NF200 (fibres myélinisées), CGRP (fibres non myélinisées, peptidergiques) et IB4 (fibres non myélinisées, non peptidergiques), ne se chevauchant pas. D'autres marqueurs (enzymes, neuropeptides, hormones, récepteurs) se surajoutant à ce premier niveau sont représentés autour de ce diagramme (Priestley et al., 2002).

3. PROJECTIONS CENTRALES DU SYSTEME SOMESTHESIQUE PERIPHERIQUE

Toutes les FAP, nociceptives ou non, émettent une projection axonale au niveau de la substance grise de la moelle épinière, qui constitue la première étape de l'intégration et de la modulation de l'information sensorielle. La substance grise spinale est divisée en dix couches ou laminae selon le système décrit par Bror Rexed (Rexed, 1952), distinctes par leur anatomie et par les types cellulaires rencontrés (voir Figure 11).

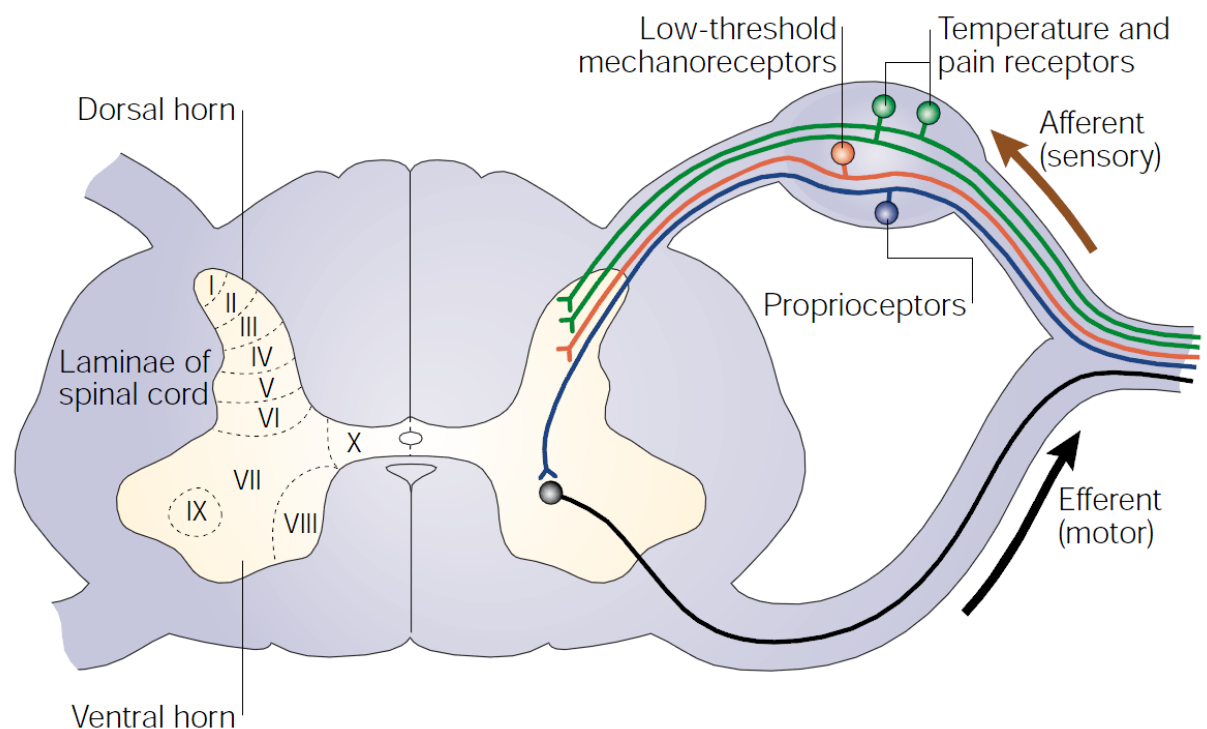


Figure 11. Projections centrales des fibres afférentes primaires.

Sur la droite de ce schéma sont représentées les projections des FAP selon leur nature. Sur la partie gauche sont délimitées les différentes couches des cornes dorsales et ventrales de la moelle épinière. Les thermorécepteurs à bas seuil et les nocicepteurs projettent principalement dans les couches superficielles I et II. Les couches III, IV et V, plus profondes, reçoivent les projections des récepteurs tactiles cutanés. Les propriocepteurs projettent quant à eux dans les couches profondes des cornes dorsales et dans la corne ventrale (VI à IX). Ici, le propriocepteur représenté contacte un motoneurone de la corne ventrale, illustrant le réflexe myotatique (Patapoutian et al., 2003).

- **Les couches I à VI** forment les cornes dorsales de la moelle épinière et reçoivent les afférences sensorielles. Les nocicepteurs cutanés innervent les couches superficielles I (zone marginale) et II externe (substance gélatineuse), ainsi que la couche V pour les fibres A δ . Les nocicepteurs d'origine musculaire et viscérale projettent quant à eux au niveau des couches I, V et VI, et I, V, VII et X, respectivement. Les afférences somesthésiques non nociceptives projettent dans les couches III, IV et V (Le Bars et Adam, 2002).

Introduction et bases bibliographiques

Le système nerveux nociceptif périphérique

- **La lamina VII** forme la couche intermédiaire et **les laminae VIII et IX** les cornes ventrales, dans lesquelles se trouvent les corps cellulaires des neurones moteurs (motoneurones) innervant les muscles squelettiques. Les propriocepteurs projettent au niveau des couches IV à IX, intervenant dans la proprioception consciente (corne dorsale), ou dans le réflexe myotatique par contact direct avec un motoneurone (corne ventrale), comme illustré par la Figure 11.
- **La couche X**, ou commissure grise, est enfin formée de substance grise entourant le canal de l'épendyme. Elle reçoit également des projections afférentes, principalement nociceptives.

Pour résumer, les cornes dorsales sont principalement impliquées dans la perception sensorielle, avec une spécialisation nociceptive des couches I et II, et une convergence de fibres nociceptives et non nociceptives au niveau de la couche V. Les cornes ventrales émettent l'innervation motrice et peuvent recevoir les afférences proprioceptives de manière directe. Au niveau médullaire, les fibres afférentes primaires projettent également sur différents types de neurones de second ordre (ou neurones de projection), répartis en trois classes :

- **Classe I** - Ces neurones sont dits "**à bas seuil**" puisqu'ils reçoivent des afférences non nociceptives. Ils interviennent dans la transmission de l'information tactile, thermique discriminatrice et proprioceptive consciente.
- **Classe II** - Ce sont les **neurones à convergence** (ou **WDR** pour "Wide Dynamic Range") qui portent ce nom en raison de leur innervation mixte, nociceptive et non nociceptive. Principalement situés au niveau de la couche V, leur champ récepteur peut varier par exemple de quelques phalanges à un bras entier, avec une activité qui va en décroissant au fur et à mesure que la stimulation est éloignée du centre de ce dernier (Calvino et Grilo, 2006).
- **Classe III** - Ces neurones reçoivent des afférences purement nociceptives et sont dits **NS** pour "Nociceptive-Specific". Ils sont principalement situés dans les couches externes des cornes dorsales de la moelle épinière et reçoivent des afférences cutanées, musculaires ou viscérales. Leur champ récepteur est réduit.

L'existence de ces différentes classes de neurones de second ordre va permettre de conserver la dissociation entre les différents systèmes (nociceptifs et non nociceptifs) au niveau du système nerveux central. L'existence des neurones de classe II, WDR, va quant à elle permettre une modulation médullaire de l'information douloureuse appelée "gate-control". Ce mécanisme, proposé par Melzack et Wall (1965), consiste en une inhibition du neurone WDR par les fibres de gros diamètre (tactiles) impliquant des interneurones GABAergiques. Une stimulation mécanique légère (ex : frottement de la

main sur une zone douloureuse) va donc permettre de diminuer la sensation de douleur perçue. D'autres sources de modulation existent, positives comme le wind-up¹¹, ou négatives comme via l'activation des contrôles inhibiteurs descendants¹². La moelle épinière n'est donc pas un simple relais entre le système nerveux périphérique et le cerveau, mais également un important lieu de modulation.

Les neurones de projection recevant des afférences nociceptives émettent des prolongements en direction du tronc cérébral et du cerveau, formant différents faisceaux innervant un grand nombre de noyaux supraspinaux impliqués dans les composantes sensori-discriminatives, végétatives ou encore cognitivo-émotionnelles de la douleur (Le Bars et Adam, 2002; Basbaum et al., 2009). Par exemple, le **faisceau spinothalamique** projette au niveau du thalamus, et particulièrement au niveau du thalamus latéral en ce qui concerne les neurones issus des cornes postérieures de la moelle épinière. Ce système intervient dans la composante sensori-discriminative de la douleur, via un troisième neurone projetant sur les cortex somesthésiques. Le **faisceau spinoréticulaire** projette quant à lui au niveau du tronc cérébral sur la formation réticulée, élaborant les réponses physiologiques (végétatives) à la douleur. On peut enfin citer le **faisceau spinoparabrachial** qui, après avoir fait synapse dans le noyau parabrachial du tronc cérébral, permet l'activation de certaines régions impliqués dans la composante affective et émotionnelle de la douleur (cortex insulaire et cingulaire, amygdale...).

Ce travail de thèse s'inscrit dans une logique de recherche de cibles pharmacologiques nouvelles pour le développement d'antalgiques, via la compréhension des mécanismes de transduction des stimuli par les nocicepteurs, en conditions normale et pathologiques. Le chapitre suivant a donc pour but de présenter les acteurs moléculaires de la transduction sensorielle nociceptive, en accordant une importance particulière aux canaux sodiques dépendants du voltage, effecteurs de l'excitabilité cellulaire, et dont le canal Nav1.9 fait partie.

¹¹ Suite à des décharges répétées, les récepteurs au N-méthyl-D-aspartate portés par les neurones de second ordre vont être activés de manière durable et sensibiliser ce dernier. C'est le phénomène de "potentialisation à long terme" qui contribue ici au wind-up.

¹² Certains neurones des noyaux du raphé projettent directement au niveau des cornes dorsales de la moelle épinière, établissant des synapses inhibitrices avec les neurones de second ordre. Cette zone du cerveau, activée suite à une stimulation douloureuse, va exercer un rétrocontrôle négatif sur les neurones nociceptifs médullaires via l'activation de ces faisceaux inhibiteurs descendants, diminuant ainsi la douleur perçue (Millan, 2002).

III. LA TRANSDUCTION NOCICEPTIVE ET LE ROLE CLE DES CANAUX NAV

La transduction des stimuli douloureux en messages nerveux constitue la première étape de la nociception. Elle fait intervenir un grand nombre de protéines qui représentent autant de cibles pharmacologiques potentielles pour le développement de traitements antalgiques. Ce mécanisme par lequel un signal physico-chimique est codé en PA puis transmis aux neurones médullaires se décompose en plusieurs étapes, faisant intervenir des acteurs différents.

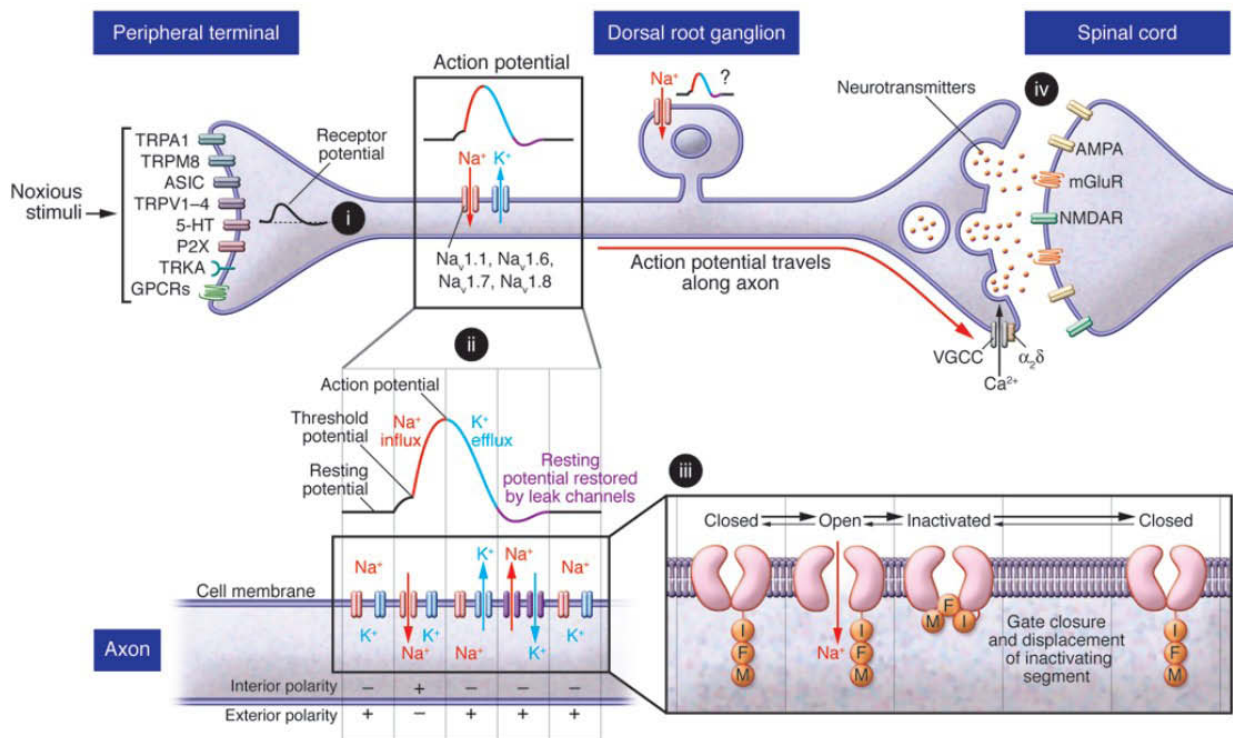
Introduction et bases bibliographiques

La transduction nociceptive et le rôle clé des canaux Nav

- Dans un premier temps, le stimulus est perçu par des **canaux transducteurs** (ou par des récepteurs métabotropiques pour certains ligands chimiques notamment d'origine inflammatoire, voir chapitre I.2 p. 62). L'ouverture de ces canaux va générer un flux d'ions dépolarisant¹³ et la somme des courants individuels générés par l'ensemble des canaux activés va constituer le potentiel de récepteur, dont l'amplitude et la durée sont respectivement proportionnelles à l'intensité et à la durée de stimulation (voir Figure 12, i).
- Le potentiel récepteur va se propager jusqu'à la zone gâchette à la base de l'axone, zone très riche en **canaux ioniques dépendants du voltage** (Nav et Kv, sélectifs du sodium et du potassium, respectivement). Si le potentiel de récepteur crée une dépolarisation suffisante, au-delà du seuil d'activation des canaux Nav, un ou plusieurs PA seront émis (voir Figure 12, ii), consistant en une entrée massive de sodium à l'origine d'une inversion du potentiel de membrane puis de l'activation des canaux potassiques à rectification retardée (Kv). Ces derniers vont permettre, via la sortie d'ions potassium, un retour rapide au potentiel de repos hyperpolarisé de la membrane.
- Les PA émis au niveau de la zone gâchette vont être conduits sans déperdition jusqu'à la terminaison médullaire du nocicepteur, où cette dépolarisation va provoquer l'ouverture des canaux Cav (calciques et dépendants du voltage) et la sécrétion de neurotransmetteurs déclenchée par l'augmentation du calcium intracellulaire (voir Figure 12, iii et iv). La conduction axonale du train de PA se fait directement, sans passage par le corps cellulaire. Ce dernier reçoit cependant "une copie du message" générée au niveau de la jonction en T. Le rôle de cette excitation des corps cellulaires est mal connu et suscite étrangement peu d'intérêt. L'hypothèse la plus communément admise fait part d'un impact de cette activité électrique sur l'expression de certains gènes, permettant notamment un rétrocontrôle sur l'excitabilité des terminaisons nerveuses (Devor, 1999).

Les canaux transducteurs sont donc les effecteurs primaires de la transduction, produisant le courant à l'origine de l'activation des canaux Nav qui sont quant à eux les effecteurs secondaires, indispensables à la génération d'un message nerveux. Les chapitres suivants ont pour but de présenter les principaux canaux transducteurs, donnant une image de leur diversité et de leur spécialisation, ainsi que les canaux Nav, qui en fonction de leurs propriétés électrophysiologiques et de leur localisation subcellulaire, vont participer de manière différente à l'intégration du potentiel récepteur et/ou à la conduction nerveuse jusqu'à la moelle épinière.

¹³ A l'exception des canaux potassiques qui vont générer un courant hyperpolarisant et avoir un effet opposé.



1. CANAUX TRANSDUCTEURS

Les FAP expriment un large panel de canaux ioniques capable de détecter une stimulation mécanique, thermique ou chimique, selon une combinatoire qui va définir leur classe fonctionnelle (Belmonte et Viana, 2008). Un aperçu des connaissances actuelles sur ces canaux est donné par le Tableau 2. Certains d'entre eux sont spécifiques d'une modalité de stimulation, comme par exemple le canal TRPM8 activé par le froid et certains agonistes exogènes à effet "rafraichissant" (menthol..., McKemy et al., 2002), et d'autres sont activables par différents stimuli, comme le canal potassique TREK-1 (pour "Tandem pore domain weak inward rectifying K⁺ (TWIK) Related K⁺ Channel 1") activé par l'étirement membranaire, les températures chaudes, les protons ou l'acide arachidonique (Maingret et al., 1999b; Noël et al., 2009).

Il faut aussi noter que les activations observées *in vitro* n'ont pas toujours de conséquences *in vivo*. Par exemple, le canal TRPV4, activé par le chaud *in vitro*, ne contribue pas à la définition des

Introduction et bases bibliographiques

La transduction nociceptive et le rôle clé des canaux Nav

seuils de sensibilité au chaud *in vivo* (Huang et al., 2011). Des résultats contradictoires existent également concernant l'implication du canal TRPV3 dans la sensibilité au chaud *in vivo* (Moqrich et al., 2005; Huang et al., 2011).

Transducteur	Rôle <i>in vitro</i>	Rôle <i>in vivo</i>	Références
Mécanique			
ASIC1	↑ excitabilité des FAP viscérales chez les KO		(Page et al., 2005)
ASIC2	↑, ↓ ou = excitabilité des FAP viscérales chez les KO, selon le type de FAP		(Page et al., 2005)
ASIC3	↓ excitabilité FAP viscérales chez KO ; ↑ ou ↓ excitabilité des FAP cutanées chez les KO, selon le type de FAP		(Price et al., 2001; Page et al., 2005)
TRPA1		↓ sensibilité mécanique chez les KO	(Brierley et al., 2009; Kwan et al., 2009)
TRPV4		↓ sensibilité mécanique chez les KO	(Suzuki et al., 2003)
TRPC1	Activé par l'étirement membranaire		(Maroto et al., 2005)
TREK-1 TRAAK	Activés par l'étirement membranaire	↑ sensibilité mécanique chez les KO TREK-1 ou TRAAK	(Maingret et al., 1999a, 1999b; Alloui et al., 2006; Noël et al., 2009)
P2X ₃	Activation indirecte par l'ATP sécrétée par les kératinocytes		(Burnstock, 2009a)
Cav3.2	Rôle dans l'excitabilité des fibres D-hair		(Dubreuil et al., 2004)
Piezo1/2	≠ canal ionique, mais nécessaire à l'induction d'un courant mécano-induit dans les FAP		(Coste et al., 2010)
Thermique			
TRPV1	Activé par le chaud intense	↓ sensibilité au chaud chez les KO	(Caterina et al., 1997, 2000)
TRPV2	Activé par le chaud intense		(Caterina et al., 1999)
TRPV3	Activé par le chaud modéré, présent dans les kératinocytes (rôle indirect)	↓ sensibilité au chaud chez les KO	(Peier et al., 2002c)
TRPV4	Activé par le chaud modéré		(Güler et al., 2002)
TRPM3	Activé par le chaud intense	↓ sensibilité au chaud chez les KO	(Vriens et al., 2011)
TRPM8	Activé par le froid modéré	↓ sensibilité au froid chez les KO	(McKemy et al., 2002; Bautista et al., 2007)

Transducteur	Rôle <i>in vitro</i>	Rôle <i>in vivo</i>	Références
TRPA1	Activé par le froid intense (études contradictoires)	↓ ou = sensibilité au froid chez les KO	(Bautista et al., 2006; Kwan et al., 2006; Karashima et al., 2009)
TREK-1 TRAAK	Activés par le chaud modéré	↑ sensibilité au froid chez double KO, et au chaud chez les KO TREK-1 et TRAAK simples	(Alloui et al., 2006; Noël et al., 2009)
Nav1.8	Rôle dans l'excitabilité neuronale à basse température	↓ sensibilité au froid chez KO	(Zimmermann et al., 2007)
Chimique (ionotropiques seuls)			
ASIC1-4	Activés par les protons (pH acide)		(Gold et Caterina, 2008)
TRPV1	Activé par les vanilloïdes (capsaïcine...), certains acides gras (acide arachidonique...) et cannabinoïdes (anandamide...) et par des lipides pro-inflammatoires (leucotriènes).		(Gold et Caterina, 2008)
TRPA1	Une très large gamme de composés irritants (voir p. 115)	Résistance à l'isothiocyanate d'allyle, au cinnamaldéhyde, à l'huile de moutarde	(Bautista et al., 2006)
TRPM8	Menthol	Résistance à l'iciline et au menthol	(McKemy et al., 2002; Colburn et al., 2007; Gentry et al., 2010)
TREK-1 TRAAK	Activité modulée par le pH, l'acide arachidonique ou les anesthésiques volatiles		(Maingret et al., 1999a, 1999b)
P2X ₁₋₆	Activés par les purines (ATP)		(Burnstock, 2009b)
5-HT ₃	Activé par la sérotonine		(Camilleri, 2010)

Tableau 2. Transducteurs moléculaires des fibres afférentes primaires.

KO = knock-out ; ASIC = Acid-Sensing Ion Channel ; TRP = Transient Receptor Potential ; TRAAK = Tandem pore domain weak inward rectifying K⁺ (TWIK) Related Arachidonic Acid-stimulated K⁺ channel ; TREK = Tandem pore domain weak inward rectifying K⁺ (TWIK) Related K⁺ Channel ; 5-HT = 5-Hydroxytryptamine

La transduction de signaux chimiques est en grande partie assurée par des récepteurs métabotropiques ou couplés à une tyrosine kinase (ne figurant pas dans ce tableau), responsables d'une sensibilisation des nocicepteurs plutôt que d'une activation directe. Dans leur grande majorité, ils sont activés par les facteurs de croissance et les médiateurs de l'inflammation. Ces récepteurs sont présentés dans la partie I.2 (voir p. 62).

Introduction et bases bibliographiques

La transduction nociceptive et le rôle clé des canaux Nav

La recherche fondamentale et préclinique a fait de grands progrès dans l'identification de canaux transducteurs potentiellement intéressants pour le développement d'antalgiques. On constate cependant que ces succès n'ont que rarement abouti à la mise sur le marché de nouveaux médicaments (Burgess et Williams, 2010). Seulement 4 médicaments parmi les 54 antalgiques sortis entre 1990 et 2010 sont en effet issus de mécanismes nouvellement découverts (les autres étant basés sur des mécanismes déjà connus, ou pour la majorité de simples reformulations de molécules existantes). Parmi ces 4 nouveaux antalgiques, seul un, le Qutenza[®], agit sur un canal transducteur (patch désensibilisant à la capsaïcine, ciblant TRPV1). Il faut donc élargir les recherches à d'autres acteurs de la nociception. Nous proposons par ce travail une action en aval des canaux transducteurs, directement sur les canaux sodiques dépendants du voltage. Ces acteurs jouent en effet un rôle clé dans la transduction des stimuli puisqu'ils sont les effecteurs directs de l'excitabilité neuronale. Nous allons voir dans le chapitre suivant que certains de ces canaux sont de plus spécifiques des voies de la nociception, ce qui est le cas du canal Nav1.9. Le blocage de telles cibles pharmacologiques pourrait représenter un intérêt potentiel dans la recherche d'antalgiques innovants.

2. CANAUX SODIQUES DÉPENDANTS DU VOLTAGE

2.1. Structure

Les canaux Nav sont formés d'une sous-unité α (≈ 260 kDa) portant les fonctions fondamentales du canal, et de deux sous-unités β régulatrices (≈ 36 kDa, voir Figure 13).

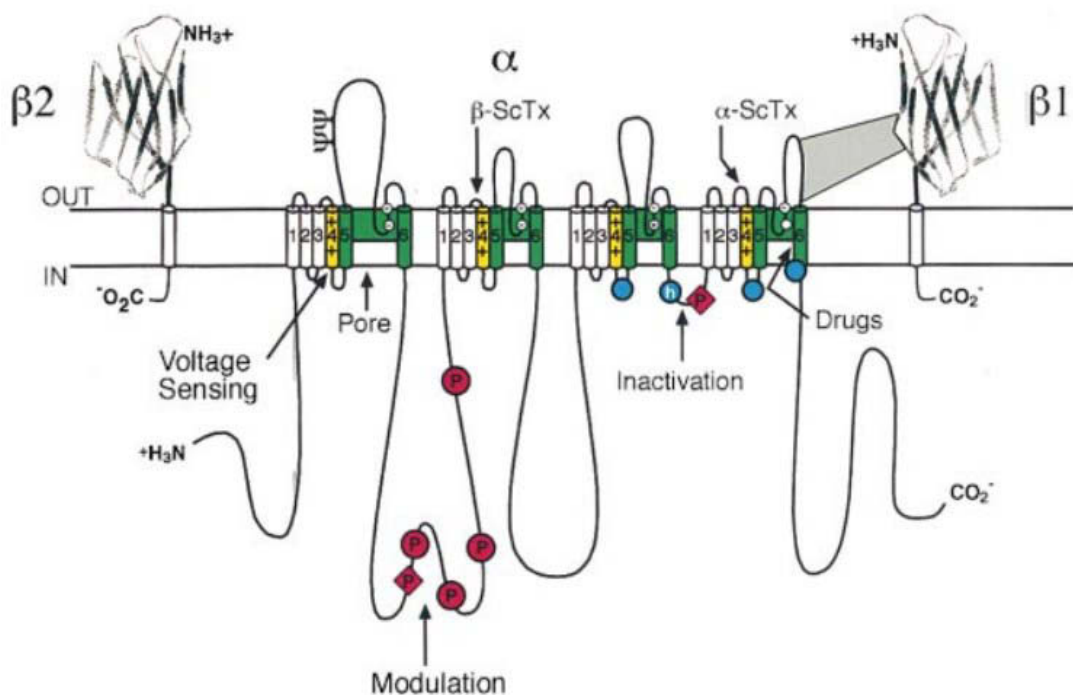


Figure 13. Structure secondaire des canaux sodiques dépendants du voltage.

Les cylindres représentent les segments transmembranaires (jaune : S4 impliqué dans la détection du potentiel ; vert : S5 et S6 impliqués dans la formation du pore). Les Ψ représentent les sites de glycosylation probables. Les cercles et les losanges rouges représentent respectivement les sites de phosphorylation par la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase C (PKC). Les cercles blancs représentent les acides aminés impliqués dans la formation du filtre de sélectivité qui sont aussi les sites de fixation de la tétrodotoxine (TTX). Les ronds bleus représentent les sites impliqués dans l'inactivation (avec h blanc : particule d'inactivation de la boucle d'inactivation). β -ScTx et α -ScTx représentent les sites de fixation des toxines de scorpion du même nom. Une liaison non-covalente est représentée entre les sous-unités α et $\beta 1$ (Catterall, 2000).

La sous-unité α est formée de 4 domaines (I à IV) de 6 segments transmembranaires (S1 à S6). Ses extrémités N- et C-terminales sont intracellulaires. Les segments S5 et S6 de chaque domaine sont séparés par une boucle rentrante dans l'espace transmembranaire et permettant la formation du **pore**. A ce niveau, deux acides aminés chargés négativement et retrouvés à des positions analogues dans les 4 domaines forment deux anneaux (externe et interne) conférant au canal sa **sélectivité pour les ions Na^+** (Schlieff et al., 1996). C'est également sur cette boucle transmembranaire que se trouvent les sites de fixation de la tétrodotoxine (TTX) et de la saxitoxine, deux toxines issues respectivement du Fugu (poisson) et de micro-organismes marins et coquillages, capables de bloquer la transmission nerveuse.

Introduction et bases bibliographiques

La transduction nociceptive et le rôle clé des canaux Nav

La fonction de **détection du potentiel** et d'**activation** du canal, est portée par le segment S4, dont l'organisation des charges électriques lui fait opérer un mouvement en réponse à une modification du champ électrique de la membrane. Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer le déplacement de S4, voir du couple S3-S4 (modèle du "paddle"), sans qu'un consensus réel n'ait pu émerger à l'heure actuelle (Tombola et al., 2006; Bosmans et al., 2011).

La boucle intracellulaire située entre les domaines III et IV porte quant à elle la fonction essentielle d'**inactivation rapide** du canal (Vassilev et al., 1988). Suite à une dépolarisation et au déplacement du segment S4, cette dernière se replie à l'intérieur du pore, bloquant le passage des ions. Le motif IFM (isoleucine-phénylalanine-méthionine) hydrophobe qu'elle porte est essentiel (mais non suffisant) à cette fonction. L'inactivation rapide permet la repolarisation neuronale lors de l'émission des PA. Un phénomène d'**inactivation lente** existe également (quelques secondes contre quelques millisecondes pour l'inactivation rapide). Ce dernier serait à l'origine de la diminution de fréquence des PA (pouvant aller jusqu'à l'extinction) observée dans certaines fibres en réponse à une stimulation prolongée. Le mécanisme moléculaire de l'inactivation lente reste encore à élucider, bien qu'on sache qu'il serait indépendant de la boucle d'inactivation rapide et plutôt lié à un réarrangement du pore (Rush et al., 2007).

Les 4 domaines sont reliés entre eux par d'importantes boucles intracellulaires, portant des **sites de phosphorylation** par la protéine kinase A (PKA) ou par la protéine kinase C (PKC). Les premiers permettent une augmentation du pic de courant produit par le canal, sans changement de ses propriétés d'activation et d'inactivation (Smith et Goldin, 1996). La phosphorylation des seconds est à l'origine d'une diminution du pic de courant ainsi que d'une augmentation de la période d'inactivation du canal, en raison de la localisation d'un des sites de phosphorylation au sein même de la boucle reliant les domaines III et IV (West et al., 1991).

Les sous-unités β possèdent un seul segment transmembranaire, une courte queue C-terminale intracellulaire, et un large domaine N-terminal extracellulaire organisé en domaine immunoglobuline. 4 sous-unités $\beta 1$ à $\beta 4$ ont été identifiées (auxquelles il faut ajouter le variant d'épissage $\beta 1B$ qui est une forme sécrétée, non membranaire). Les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 3$ sont liées de façon non-covalente à la sous-unité α , alors que les sous-unités $\beta 2$ et $\beta 4$ forment des ponts disulfure avec la sous-unité α . Ces protéines accessoires jouent un rôle dans la modulation du canal (cinétique d'activation/inactivation et dépendance au voltage), mais interagissent également avec le cytosquelette et la matrice extracellulaire pour définir la localisation cellulaire ainsi que l'expression fonctionnelle du canal (Wood et al., 2004; Brackenbury et Isom, 2008). Les sous-unités β ont pu être reliées à différentes pathologies neuronales comme l'épilepsie, l'arythmie, la sclérose en plaques, certains troubles psychiatriques, mais aussi dans la douleur neuropathique (Brackenbury et Isom, 2011). Le knock-out de la sous-unité

$\beta 2$ chez la souris (Pertin et al., 2005) permet par exemple de réduire l'hypersensibilité mécanique induite par section du nerf péronéal (SNI pour "Spared Nerve Injury").

2.2. Diversité des sous-unités α

Neuf isoformes différentes de la sous-unité α des canaux Nav, notées Nav1.1 à Nav1.9, ont été caractérisées¹⁴. Elles sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Canal (autres dénominations) <i>GENE</i>	Cinétique d'inactivation	Sensibilité à la tétrodotoxine	Principaux territoires d'expression
Nav1.1 (Type I) <i>SCN1A</i>	Rapide	TTX-S	SNC, cœur, DRG (forte expression dans les neurones de gros diamètre)
Nav1.2 (Type II) <i>SCN2A</i>	Rapide	TTX-S	SNC, DRG (faible expression)
Nav1.3 (Type III) <i>SCN3A</i>	Rapide	TTX-S	SNC
Nav1.4 ($\mu 1$, SkM1) <i>SCN4A</i>	Rapide	TTX-S	Muscle squelettique
Nav1.5 (h1, SkM2) <i>SCN5A</i>	Lente	TTX-R	Cœur
Nav1.6 (NaCh6, Type VI, PN4) <i>SCN8A</i>	Rapide	TTX-S	SNC, DRG (forte expression dans les neurones de gros et moyen diamètre)
Nav1.7 (PN1, hNe, Nas) <i>SCN9A</i>	Rapide	TTX-S	SNC, DRG (tous les neurones)
Nav1.8 (PN3, SNS) <i>SCN10A</i>	Lente	TTX-R	DRG (forte expression dans les fibres de petit diamètre)
Nav1.9 (SNS2, NaN) <i>SCN11A</i>	Ultra-lente	TTX-R	DRG (forte expression dans les fibres de petit diamètre)

Tableau 3. Propriétés et principaux territoires d'expression des canaux Nav.

TTX-R = résistant à la tétrodotoxine ; TTX-S = sensible à la tétrodotoxine ; SNC = système nerveux central
D'après (Catterall, 2000; Wood et al., 2004; Amir et al., 2006).

Ces 9 sous-unités sont souvent distinguées par rapport à leur sensibilité à la TTX. Si des doses de 1 à 20 nanomolaires sont suffisantes pour bloquer les canaux TTX-S, les canaux Nav1.5, Nav1.8 et

¹⁴ Une dixième sous-unité, notée Na_x (ou NaG) et codée par le gène *SCN6A* (murin) ou *SCN7A* (humain), est rattachée à cette famille en raison d'une relative homologie de séquence (50% avec Nav1.2 chez le rat). Cependant, cette sous-unité ne se comporterait pas comme un canal dépendant du voltage, mais comme un senseur/transporteur du sodium (Shimizu et al., 2007).

Introduction et bases bibliographiques

La transduction nociceptive et le rôle clé des canaux Nav

Nav1.9 ne sont inactivés que pour des concentrations de l'ordre du micromolaire. De plus, les canaux TTX-R ont la particularité de présenter une cinétique d'inactivation lente, voir ultra-lente dans le cas du canal Nav1.9. Les canaux TTX-R constituent donc un groupe évolutif séparé (voir Figure 14), dont témoigne la localisation commune de leurs gènes respectifs sur le chromosome 3 humain, le chromosome 9 de souris ou le chromosome 8 de rat.

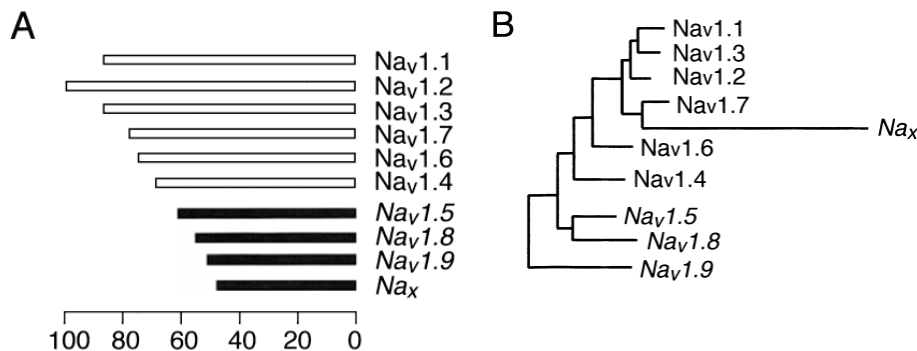


Figure 14. Distance génétique entre les différents canaux Nav chez le rat.

(A) Représentation de l'homologie de séquence entre les différents canaux Nav. Les chiffres représentés correspondent au pourcentage d'homologie des séquences protéiques des différentes sous-unités α par rapport à Nav1.2. (B) Arbre phylogénétique des 10 sous-unités Nav α connues (Ogata et Ohishi, 2002).

2.2.1. Intérêt de cette diversité pour la pharmacologie des canaux Nav

Les cliniciens ont à leur disposition et utilisent déjà de nombreuses molécules ciblant les canaux Nav. Les **anesthésiques locaux** (lidocaïne, tétracaïne, bupivacaïne...) et **antiarythmiques de classe I** (quinidine, disopyramide, méxilétine...) agissent aussi sur ces canaux en se fixant à l'intérieur du pore. Si ces molécules ont un intérêt thérapeutique certain, elles ne sont spécifiques d'aucune isoforme Nav α et ne sont par conséquent pas de bons outils pharmacologiques pour l'étude des canaux Nav et de leur rôle dans la physiopathologie de la douleur. Les propriétés d'activation/inactivation des canaux peuvent cependant jouer un rôle indirect sur l'accessibilité de leur site d'action aux anesthésiques locaux. Ainsi, le canal Nav1.5 apparaît plus sensible à la lidocaïne que le canal Nav1.2 par exemple, ce qui serait à l'origine des effets cardiaques prédominants de la lidocaïne (et par nature des antiarythmiques) quand elle est administrée par voie intraveineuse (Wright et al., 1997). Les canaux Nav sont également bloqués par certains **antidépresseurs tricycliques** (amitriptyline) et **antiépileptiques** (carbamazépine), mais là encore de manière non-spécifique, allant même jusqu'à toucher les canaux calciques et potassiques dépendants du voltage dans le premier cas (Amir et al., 2006). La carbamazépine bénéficie d'un champ d'action plus restreint, bloquant préférentiellement, mais pas exclusivement, les canaux TTX-S (Cardenas et al., 2006). La pharmacopée ne dispose donc pas à l'heure actuelle d'outils suffisamment spécifiques pour l'étude des différentes sous-unités de canaux Nav.

Un très grand nombre de **toxines naturelles** permettant de bloquer les canaux sodiques ont également été isolées à partir de venins (scorpions, araignées, anémones, coquillages...), agissant sur différents sites de la protéine et induisant des effets fonctionnels en conséquence : blocage du pore (TTX, saxitoxine, μ -conotoxines...), facilitation ou persistance de l'activation (β -ScTx de scorpion, vératridine, aconitine...), ralentissement de l'inactivation (α -ScTx de scorpion, anémone, δ -conotoxines...). Ces domaines étant cependant extrêmement conservés au travers de l'évolution, ces toxines ne possèdent pas de spécificité remarquable pour l'une ou l'autre des sous-unités α des canaux sodiques dépendants du voltage (Catterall et al., 2007). Quelques-unes d'entre elles ont tout de même montré une sélectivité pour certains sous-types. C'est le cas notamment des conotoxines produites par différentes espèces de *Conus* (coquillages marins prédateurs). Certaines permettent un blocage préférentiel, bien qu'insuffisamment spécifique, de petits groupes de canaux TTX-S et même du canal TTX-R Nav1.8 (Ekberg et Adams, 2006). Si les venins représentent un réservoir de bloqueurs potentiels très important, la recherche de ligands spécifiques n'a pas pu isoler pour l'instant de toxines complètement spécifiques d'un sous-type particulier, et un important travail de screening reste à réaliser.

La pharmacologie des canaux Nav ne permet donc pas à l'heure actuelle le blocage sélectif des différentes sous-unités α , du moins pas avec une affinité et/ou spécificité satisfaisante. La recherche préclinique et clinique compense ce manque d'outils pharmacologiques par des outils génétiques, étudiant l'impact de délétions géniques chez l'animal, ou de mutations naturelles chez l'Homme. L'identification par ce moyen de cibles thérapeutiques potentiellement intéressantes parmi les sous-unités α des canaux Nav pourra alors motiver la recherche de ligands plus spécifiques. On peut ainsi citer l'exemple le cas du canal Nav1.8, impliqué dans la douleur inflammatoire et neuropathique (voir chapitre 2.2.7 p. 53) et pour lequel l'industrie a mis au point un premier bloqueur sélectif, le A-803467 (Abbott Laboratories). Le chapitre suivant a pour but de présenter les données cliniques et précliniques existantes concernant les canaux Nav et leur implication potentielle dans la physiopathologie de la douleur¹⁵.

2.2.2. Nav1.1

Expression dans le DRG : l'ARNm (Acide Ribonucléique messenger) codant Nav1.1 est exprimé dans 25 à 33% des neurones des DRG chez le rat (Fukuoka et al., 2008). Son expression est plus forte dans les cellules de gros diamètre (Black et al., 1996). La plupart des cellules Nav1.1-positives co-expriment le marqueur NF200 (fibres A) et la réciproque touche 80% des neurones NF200-positifs.

¹⁵ Les canaux Nav1.4 et Nav1.5, non exprimés par les FAP que ce soit en condition physiologique ou pathologique, ne sont pas décrits dans ces chapitres.

Introduction et bases bibliographiques

La transduction nociceptive et le rôle clé des canaux Nav

65% des neurones Nav1.1-positifs expriment aussi le récepteur TrkC (réciproquement 52%, McMahon et al., 1994), et seulement 11% le marqueur non-peptidergique IB4 (Fukuoka et al., 2008). Le canal Nav1.1 est indétectable dans les terminaisons nerveuses cutanées et son expression (au niveau périphérique) présage plutôt d'un rôle dans la proprioception (Persson et al., 2010).

Propriétés électrophysiologiques : le courant produit par la sous-unité Nav1.1 n'a pas été caractérisé dans les DRG. Son expression en œuf de xénope a permis l'enregistrement d'un courant TTX-S à activation et inactivation rapides (Smith et Goldin, 1998). Les cinétiques d'activation et d'inactivation du canal sont raccourcies par la co-transfection de la sous-unité $\beta 1$ et, dans une moindre mesure, $\beta 2$.

Expression chez l'animal neuropathique : l'ARNm codant Nav1.1 est diminué dans les DRG après ligature du nerf spinal (SNL pour "Spinal Nerve Ligation") ou SNI, voir Figure 15, Kim et al., 2001; Berta et al., 2008).

Expression chez l'animal en conditions inflammatoires : aucun changement des niveaux d'ARNm et de protéine n'ont été détectés après injection intraplantaire de carragénine (Black et al., 2004).

Knock-out : il n'existe pas à l'heure actuelle de souris knock-out (KO) Nav1.1.

Mutations naturelles chez l'Homme : plus de 200 mutations connues ont été reliées à des syndromes épileptiques héréditaires (Ragsdale, 2008). Quelques mutations ont aussi été associées à des cas de migraine familiale hémiplégique (Dichgans et al., 2005), mais aucun cas d'altération de la sensibilité nociceptive n'a été rapporté malgré l'existence de mutations gain ou perte de fonction (George, 2005).

➤ Le canal Nav1.1 n'est pas pressenti comme jouant un rôle particulier dans la douleur.

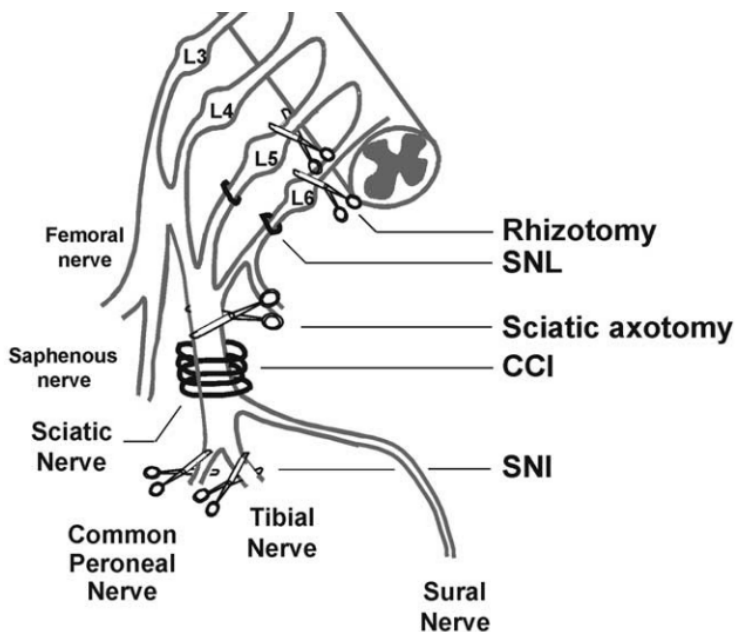


Figure 15. Principaux modèles de neuropathie traumatique utilisés chez l'animal.

SNI = Spinal Nerve Ligation ; CCI = Chronic Constriction Injury ; SNI = Spared Nerve Ligation (Decosterd et al., 2002).

2.2.3. Nav1.2

Expression dans le DRG : la sous-unité Nav1.2 est faiblement exprimée dans les DRG de rat (Black et al., 1996).

Propriétés électrophysiologiques : les propriétés électrophysiologiques du canal Nav1.2 sont très similaires à celles de Nav1.1, y compris au niveau du rôle des sous-unités régulatrices $\beta 1$ et $\beta 2$ (enregistrements en œuf de xénope, Smith & Goldin, 1998). La cinétique d'inactivation rapide du canal Nav1.2 est légèrement plus longue, tout comme sa cinétique de récupération de l'inactivation.

Expression chez l'animal neuropathique : aucune variation de l'expression de Nav1.2 n'a été détectée dans les DRG après SNI chez le rat (Berta et al., 2008). Une légère diminution de son expression (d'un niveau déjà très bas) est observée après SNL (Kim et al., 2001).

Expression chez l'animal en conditions inflammatoires : aucun changement des niveaux d'ARNm et de protéine n'a été détecté après injection intraplantaire de carragénine (Black et al., 2004).

Knock-out : la délétion du gène codant la sous-unité Nav1.2 induit une mort neuronale importante pendant le développement embryonnaire, principalement au niveau du tronc cérébral. Le KO est létal en post-natal (100% de décès à P2, Planells-Cases et al., 2000).

Mutations naturelles chez l'Homme : des mutations de la sous-unité Nav1.2 ont été reliées à des cas d'épilepsie infantile bénins (Misra et al., 2008).

- Rien ne permet d'impliquer le canal Nav1.2 dans la nociception ou dans la douleur pathologique. De plus, son intérêt en tant que cible pharmacologique est limité par le lourd phénotype observé chez les animaux KO.

2.2.4. Nav1.3

Expression dans le DRG : l'expression de la sous-unité Nav1.3 est développementale et le canal est indétectable chez le rat adulte sain (Waxman et al., 1994).

Propriétés électrophysiologiques : transfectée en lignée de cellules rénales embryonnaires humaines (HEK pour "Human Embryonic Kidney cells"), la sous-unité Nav1.3 produit un courant TTX-S à activation et inactivation rapide (Cummins et al., 2001). Sa cinétique de récupération de l'inactivation est aussi relativement rapide, mais augmente avec le potentiel de membrane. Son processus d'inactivation lente est au contraire très lent, ce qui permet au canal Nav1.3 de produire de larges courants de rampe (courant Na^+ entrant en réponse à une rampe de dépolarisation lente, de -100 à +40 mV en 600 ms).

Introduction et bases bibliographiques

La transduction nociceptive et le rôle clé des canaux Nav

Expression chez l'animal neuropathique : la sous-unité Nav1.3 est réexprimée chez le rat dans les DRG après axotomie (Waxman et al., 1994) et neuropathie diabétique induite par injection de streptozotocine (Hong et al., 2004). Après SNL, une reprise de l'expression est observée dans 40 à 47% des neurones, préférentiellement de gros et moyen diamètre (Fukuoka et al., 2008). Après section des racines ventrales (motrices), une reprise de l'expression de Nav1.3 est également montrée dans les DRG (He et al., 2010). Enfin, on retrouve une accumulation de canaux Nav1.3 au niveau de névromes chez l'Homme (Black et al., 2008).

Expression chez l'animal en conditions inflammatoires : une augmentation des quantités d'ARNm et de protéine a été détectée après injection intraplantaire de carragénine (Black et al., 2004).

Knock-out/knock-down : deux KO conditionnels ont été réalisés, avec une délétion restreinte soit aux nocicepteurs (système Nav1.8-Cre), soit à l'ensemble du système nerveux en post-natal (Nassar et al., 2006). Les auteurs n'ont observé aucun impact sur la douleur chez des souris saines, enflammées (formol plantaire) ou encore neuropathiques (ligature du nerf spinal L5). Deux études de knock-down par injections intrathécales d'ODN (Oligodéoxynucléotides) antisens chez le rat ont montré soit une diminution de l'hypersensibilité soit une absence d'effet chez les modèles de ligature du nerf sciatique (CCI pour "Chronic Constriction Injury") et SNI, respectivement (Hains et al., 2003; Lindia et al., 2005).

Mutations naturelles chez l'Homme : il n'existe pas de mutations connues chez l'Homme de cette sous-unité.

- Le canal Nav1.3 pourrait être impliqué dans les douleurs neuropathiques, mais les études sont pour l'instant trop peu nombreuses et contradictoires.

2.2.5. Nav1.6

Expression dans le DRG : le territoire d'expression de Nav1.6 est très proche de celui de Nav1.1 dans le DRG, fortement colocalisé avec le marqueur NF200 (Fukuoka et al., 2008). Le canal a cependant aussi été retrouvé dans les axones non myélinisés des FAP (Black et al., 2002). Contrairement au canal Nav1.1, le canal Nav1.6 est observable dans les terminaisons libres cutanées (Persson et al., 2010).

Propriétés électrophysiologiques : le courant Nav1.6 possède des cinétiques d'activation et d'inactivation rapides, similaires à ce que l'on peut observer chez les autres canaux TTX-S (Herzog et al., 2003). Il a par contre la particularité de récupérer très rapidement de l'inactivation, ce qui pourrait conférer aux fibres l'exprimant la capacité de soutenir des décharges de PA à haute fréquence.

Expression chez l'animal neuropathique : une diminution de l'expression de l'ARNm Nav1.6 a été observée dans les DRG de rats après SNL et SNI (Berta et al., 2008). La protéine voit également son expression diminuer après induction d'une neuropathie diabétique par injection de streptozotocine (Hong et al., 2004).

Expression chez l'animal en conditions inflammatoires : les niveaux d'ARNm et de protéine Nav1.6 sont inchangés dans les DRG après injection intraplantaire de carragénine (Black et al., 2004).

Knock-out : le KO Nav1.6 induit de graves désordres neuromusculaires (ataxie, dystonie et paralysie) et est létal à 3-4 semaines postnatal, âge auquel la myélinisation du système nerveux central (SNC) est en intense développement (García et al., 1998).

Mutations naturelles chez l'Homme : il n'existe pas de mutations connues chez l'Homme de cette sous-unité.

- La contribution du canal Nav1.6 à la nociception et à la douleur pathologique n'est pas claire. Il assure des fonctions vitales, probablement via un rôle important dans l'excitabilité des fibres myélinisées du système nerveux périphérique et central, ce qui rend compliqué son étude dans la physiopathologie de la douleur et limite sérieusement son intérêt thérapeutique.

2.2.6. Nav1.7

Expression dans le DRG : son expression est prédominante dans les neurones de petit diamètre (Black et al., 1996). La quasi-totalité des neurones NF-200 négatifs expriment le canal Nav1.7 (Fukuoka et al., 2008; Dib-Hajj et al., 2010). Il est également retrouvé au niveau des terminaisons libres cutanées (Persson et al., 2010).

Propriétés électrophysiologiques : comme tous les canaux TTX-S, le canal Nav1.7 possède des cinétiques d'activation et d'inactivation rapides. Il montre cependant une cinétique de récupération de l'inactivation plus lente que ses homologues (Herzog et al., 2003). Ceci est en accord avec l'observation faite que les fibres de type A, exprimant préférentiellement la sous-unité Nav1.6, sont capables de soutenir une fréquence de PA plus élevée que les fibres C, exprimant plus fortement la sous-unité Nav1.7 (Cummins et al., 2007). Sa cinétique d'inactivation est également plus lente à des potentiels hyperpolarisés, proches du potentiel de repos. Ceci pourrait contribuer à la capacité du canal Nav1.7 à produire des courants de rampe (Herzog et al., 2003). Cette dernière propriété impliquerait Nav1.7 dans la régulation de l'excitabilité des neurones de petit diamètre, via une modulation du seuil de génération des PA.

Expression chez l'animal neuropathique : l'expression de la sous-unité Nav1.7 augmente chez le rat rendu diabétique par injection de streptozotocine (Hong et al., 2004), et diminue après SNI et SNL

Introduction et bases bibliographiques

La transduction nociceptive et le rôle clé des canaux Nav

(Kim et al., 2002; Berta et al., 2008). Chez l'Homme, on retrouve une accumulation de la protéine au niveau de névromes (Bird et al., 2007).

Expression chez l'animal en conditions inflammatoires : chez le rat, l'ARNm et la protéine Nav1.7 sont surexprimés dans les DRG suite à une injection intraplantaire de carragénine ou à une monoarthrite induite par injection d'adjuvant complet de Freund (CFA pour "Complete Freund Adjuvant") dans l'articulation du genou (Black et al., 2004; Strickland et al., 2008).

Knock-out/knock-down : le KO Nav1.7 est létal en post-natal, principalement à cause d'une difficulté à s'alimenter des animaux (Nassar et al., 2004). Ce phénotype peut impliquer les canaux Nav1.7 exprimés dans le SNC, mais aussi dans les systèmes nerveux sympathique ou entérique. Un KO conditionnel restreint aux nocicepteurs exprimant la sous-unité Nav1.8 a été généré dans la même étude. Ces animaux ont une forte diminution de leurs seuils de douleur en réponse à une stimulation mécanique, et dans une moindre mesure, au chaud. La réponse de ces animaux à une injection intraplantaire de formol est diminuée pendant les deux phases du test (non-inflammatoire et inflammatoire). Suite à une injection intraplantaire de CFA, les souris KO ne développent pas d'hypersensibilité thermique (chaud) ou mécanique. Un résultat similaire est observé après knock-down de Nav1.7 par injection intraplantaire d'un vecteur viral (Yeomans et al., 2005), impliquant de manière équivalente les fibres A δ et C. Le KO Nav1.7 n'a pas d'impact sur la douleur neuropathique induite par SNL (Nassar et al., 2005).

Mutations naturelles chez l'Homme : plusieurs mutations du gène *SCN9A* codant la sous-unité Nav1.7 (gain ou perte de fonction) sont reliées à d'importants troubles de la sensibilité douloureuse, pouvant donner lieu à 3 pathologies différentes (Dib-Hajj et al., 2007) :

- l'érythromélgie est caractérisée par une rougeur des extrémités et des douleurs de type brûlure, déclenchées par la chaleur modérée ou l'exercice. Cette pathologie est provoquée par des mutations facilitatrices de l'activation du canal, occasionnant dans les neurones sensoriels des décharges en réponse à des stimulations infraliminaire, ainsi qu'une augmentation de la fréquence des PA émis pour une même stimulation (Cummins et al., 2007).

- le syndrome de douleur extrême paroxystique se manifeste dès la naissance par des crises de douleur intense touchant les régions rectale, oculaire et mandibulaire. L'élément déclencheur étant le plus souvent la défécation (chez l'enfant), les rapports sexuels ou les coups. Ce syndrome est causé par des mutations impactant l'inactivation du canal Nav1.7, résultant en une inactivation incomplète et en la persistance de courants sodiques (Cummins et al., 2007). Contrairement à l'érythromélgie, ce syndrome se traite bien par la carbamazépine.

- l'insensibilité congénitale à la douleur, provoquée par une mutation non-sens du gène *SCN9A*, est un trouble caractérisé par l'absence totale de toute sensation douloureuse (brûlure, fracture,

morsures...), normale ou pathologique, et somatique ou viscérale. Elle n'est pas associée à un déficit de sensibilité thermique (discriminative), tactile ou proprioceptive (Cox et al., 2006).

- Le canal Nav1.7 est fortement impliqué dans la douleur aiguë ainsi que dans l'hypersensibilité douloureuse inflammatoire. L'insensibilité à la douleur causée chez l'Homme par une mutation non-sens permet de présager d'une efficacité importante des bloqueurs de Nav1.7 utilisés en tant qu'antalgiques. Le lourd phénotype observé chez les souris knock-out impose cependant la prudence.

2.2.7. Nav1.8

Expression dans le DRG : le canal Nav1.8 est exprimé par les fibres de petit diamètre des DRG (Dib-Hajj et al., 2010). La quasi-totalité des fibres C (NF-200-négatives) expriment Nav1.8, et une forte colocalisation est par conséquent observée avec les marqueurs TrkA et IB4, respectivement peptidergique et non-peptidergique (Fukuoka et al., 2008). Environ un tiers des neurones NF200-positifs expriment également cette sous-unité. Il est très intéressant de noter que ce canal est exprimé dans les DRG de manière très prédominante (Sangameswaran et al., 1996). Une faible expression cardiaque a tout de même été rapportée récemment et corrélée à une diminution de l'intervalle PR chez les souris Nav1.8^{-/-} (Chambers et al., 2010).

Propriétés électrophysiologiques : le canal Nav1.8 produit un courant TTX-R dont les cinétiques d'activation et d'inactivation rapide sont plus lentes que celles observées chez les canaux TTX-S (Akopian et al., 1996; Sangameswaran et al., 1996). Sa dépendance au voltage est également plus dépolarisée (de 30 à 40 mV par rapport aux canaux TTX-S, Cummins et al., 2007). Nav1.8 sous-tend la majeure partie du courant nécessaire à l'électrogenèse des PA dans les petites fibres. En effet, on n'observe plus de décharges de type tout-ou-rien dans les neurones Nav1.8^{-/-} (Renganathan et al., 2001). Enfin sa récupération de l'inactivation est rapide et permet de soutenir des bouffées de PA à haute fréquence, alors que son inactivation lente très marquée va limiter la durée de décharge lors d'une stimulation prolongée (Renganathan et al., 2001; Blair et Bean, 2002).

Expression chez l'animal neuropathique : l'expression transcriptionnelle de Nav1.8 est diminuée dans les DRG après axotomie, SNL et SNI (Dib-Hajj et al., 1996; Berta et al., 2008). Après ligature du nerf sciatique, une diminution de la transcription du canal est montrée, impliquant une répression épigénétique (Uchida et al., 2010). Cependant, une accumulation de la protéine Nav1.8 est observée au niveau du nerf sciatique après SNL, en aval du site de lésion (pas sur le site même de la lésion, Gold et al., 2003). Chez l'Homme, on retrouve une accumulation de canaux Nav1.8 au niveau de névromes (Black et al., 2008).

Introduction et bases bibliographiques

La transduction nociceptive et le rôle clé des canaux Nav

Expression chez l'animal en conditions inflammatoires : les niveaux d'ARNm et de protéine Nav1.8 sont augmentés dans les DRG après injection intraplantaire de carragénine (Tanaka et al., 1998; Black et al., 2004). Chez le modèle de CFA intraplantaire, on note une augmentation du nombre de fibres Nav1.8 positives. Ceci touche les fibres myélinisées comme non myélinisées (Coggeshall et al., 2004).

Knock-out/knock-down : le KO total et inconditionnel est viable et ne présente aucun déficit particulier si ce n'est une altération de sa sensibilité douloureuse mécanique (et au chaud dans une moindre mesure), ainsi qu'une diminution ou un retard d'apparition de l'hypersensibilité douloureuse induite par injection intraplantaire de carragénine (Akopian et al., 1999). La sensibilité au froid des animaux Nav1.8^{-/-} est également altérée (voir p. 121). Le KO Nav1.8 n'a pas d'impact sur l'hypersensibilité induite par ligature du nerf sciatique (Kerr et al., 2001) ou SNL (Nassar et al., 2005). Le bloqueur A-803467, récemment publié, s'est montré efficace sur plusieurs types de douleur chez le rat, inflammatoires mais aussi neuropathiques, contrairement à ce qui a été observé chez la souris KO (Jarvis et al., 2007, voir Figure 16). La diminution de la sensibilité mécanique chez l'animal sain est retrouvée. Le knock-down de Nav1.8 par injections intrathécales d'ODN antisens permet chez le rat de réduire l'allodynie mécanique induite par une injection intraplantaire de CFA, mais pas chez un modèle de douleur post-opératoire induite par incision sous-plantaire (Porreca et al., 1999; Joshi et al., 2006).

Analgesic activity of A-803467

Pain model	ED ₅₀	Effect, %
Acute nociception		
Rat acute therm.	>100	0 ± 0
Rat acute mech.	65	70 ± 4*
Inflammatory pain		
Formalin-flinching	>100	9 ± 11
Capsaicin, mech. allodynia	100	46 ± 4*
CARR, therm. hyperalgesia	100	54 ± 10*
CFA, therm. hyperalgesia Day 2	41	64 ± 6*
CFA, therm. hyperalgesia Day 4	38	71 ± 10*
CFA, mech. allodynia Day 2	>100	34 ± 15*
CFA, mech. allodynia Day 4	>100	42 ± 15*
Neuropathic pain		
SNL, mech. allodynia	47	70 ± 12*
CCI, mech. allodynia	85	56 ± 10*
CCI, cold allodynia	70	61 ± 11*
Vincristine, mech. allodynia	>100	9 ± 9
Postoperative pain		
Skin incision at 2 h	>100	14 ± 2
Skin incision at 24 h	>100	32 ± 18*
Visceral pain		
Mouse writhing assay (s.c.)	>100	34 ± 6*
Cyclophosphamide, cystitis	>100	0 ± 10
Colonic distension (MED)	100	25 ± 5*
Motor effects ^t		
Locomotor activity	>300	12 ± 12
Rotorod performance	>300	0 ± 0
Edge balance	>300	0 ± 0

Percent analgesic effect assessed at 100 mg/kg, i.p. *, significantly different ($P < 0.05$) from vehicle-treated animals ($n = 6-12$ per experimental group). t, percent effect tested at 300 mg/kg, i.p. therm., thermal; mech., mechanical; MED, minimum effective dose; CCI, chronic constriction injury, SNL, spinal nerve ligation.

Figure 16. Efficacité antalgique du bloqueur des canaux Nav1.8 A-803467 dans différents modèles de douleur chez le rat. (Jarvis et al., 2007)

modification des seuils de douleur n'est observée chez l'animal sain.

Mutations naturelles chez l'Homme : il n'existe pas de mutations connues chez l'Homme de cette sous-unité.

- Le canal Nav1.8 est un candidat intéressant pour le développement de molécules à visée antalgiques. La délétion de son gène permet de réduire la perception de la douleur chez l'animal sain, et l'hypersensibilité douloureuse chez l'animal enflammé, mais aussi et pour la première fois, neuropathique (parmi la famille des canaux Nav). Il reste cependant des divergences entre les études, et seul l'impact sur la douleur inflammatoire bénéficie d'un consensus. Son expression restreinte aux FAP et le phénotype normal des animaux KO permet cependant de penser que de telles molécules bénéficieraient d'un ratio bénéfice/risque favorable.

Introduction et bases bibliographiques

La transduction nociceptive et le rôle clé des canaux Nav

2.2.8. Nav1.9

Expression dans le DRG : le canal Nav1.9 a un territoire d'expression très proche de Nav1.8. Il n'est retrouvé que dans les DRG et TG (et dans le système nerveux entérique, voir ci-dessous) où il est exprimé dans 83% des fibres de petit diamètre (<30 μm) et 19% des fibres de gros diamètre (Dib-Hajj et al., 1998). 61,5% des neurones des DRG sont positifs pour Nav1.9 et la quasi-totalité de la sous-population NF200-négative exprime ce canal (Fukuoka et al., 2008). Ceci est en accord avec le fait que tous les neurones Nav1.9-positifs expriment le marqueur périphérine, caractérisant les fibres C (Amaya et al., 2000). La majorité des études montrent une absence totale de colocalisation avec NF200 (Amaya et al., 2000; Benn et al., 2001). On retrouve le canal Nav1.9 le long des axones du nerf sciatique chez la souris, et il est observable au niveau des terminaisons libres périphérine-positives de la lèvre ou de la cornée (Black et Waxman, 2002; Rush et al., 2005; Padilla et al., 2007). Dans les DRG, le canal Nav1.9 est fortement colocalisé avec les récepteurs TRPV1, P2X₃ et B₂ (Amaya et al., 2006), impliqués dans l'intégration de la réaction inflammatoire (senseurs respectifs de certains eicosanoïdes et des protons, des purines et de la bradykinine). On retrouve également le canal Nav1.9 dans un tiers à la moitié des neurones TrkA-positifs, et dans environ 60% des neurones IB4-positifs (Amaya et al., 2000; Benn et al., 2001).

D'un point de vue plus fonctionnel, la plupart des nocicepteurs de type C des DRG expriment fortement le canal Nav1.9 (7/11 nocicepteurs polymodaux, 10/11 nocicepteurs silencieux, Fang et al., 2002). La moitié des nocicepteurs A δ sont clairement positifs pour Nav1.9 (7/13). Toutes les fibres A δ LTM (pour "low threshold mechanoreceptive", ou récepteurs tactiles cutanés) sont Nav1.9-négatives mais quelques fibres A α /A β (5/16) expriment faiblement Nav1.9. D'une manière générale, une corrélation négative existe entre le niveau d'expression du canal et la taille des neurones (ainsi que leur vitesse de conduction).

Une expression du canal Nav1.9 est également observée dans les plexus myentériques, au sein de 85% des neurones Dogiel de type II, mais pas dans les neurones mécanosensoriels de type S, ainsi que dans les plexus sous-muqueux (Rugiero et al., 2003; Padilla et al., 2007).

Propriétés électrophysiologiques : le canal Nav1.9 possède des propriétés électrophysiologiques très atypiques si on le compare autres canaux Nav. Ses cinétiques d'activation et d'inactivation sont extrêmement lentes (Cummins et al., 1999) et son activation est à l'origine d'un courant TTX-R persistant. Nav1.9 est de plus activé à des potentiels très dépolarisés, proches du potentiel de repos de la membrane (de -60 à -70 mV, contre -50 mV pour les canaux TTX-S et -30 à -40 mV pour le canal Nav1.8, Dib-Hajj et al., 2002). Toutes ces propriétés rendent impossible une contribution du canal Nav1.9 à la phase dépolarisante du PA. Il a alors été proposé qu'il participe à

l'amplification de dépolarisations infraliminaires, et par conséquent à la définition de l'excitabilité neuronale ainsi qu'à la prolongation des décharges de PA (Herzog et al., 2001; Baker et al., 2003). Le courant persistant produit par le canal Nav1.9 est notamment dû à un large chevauchement de ses courbes d'activation et d'inactivation, donnant lieu à l'existence d'un courant de fenêtre au sein d'une gamme de potentiels pour lesquels la probabilité d'ouverture des canaux Nav1.9 est non nulle et l'inactivation n'est pas totale.

Expression chez l'animal neuropathique : l'expression du canal Nav1.9 est diminuée dans les DRG après axotomie, CCI, SNL et SNI (Dib-Hajj et al., 1998, 1999; Tate et al., 1998; Porreca et al., 1999; Cummins et al., 2000; Decosterd et al., 2002; Berta et al., 2008). Elle n'est pas modifiée par une section des racines dorsales (Sleeper et al., 2000; Decosterd et al., 2002) mais une autre étude a montré son augmentation suite à la ligature de la racine L5 (Abe et al., 2002). Chez le rat diabétique neuropathique, l'expression du canal Nav1.9 augmente dans les fibre NF200-positives (Hong et Wiley, 2006). Après section du nerf alvéolaire inférieur (innervation de la mâchoire inférieure), une accumulation de canaux Nav1.9 est observée au niveau du site de lésion (Davies et al., 2006).

Ces observations sont également réalisées chez l'Homme souffrant de lésions du plexus brachial (grand plexus permettant le réarrangement des fibres issues de C5 à T1), avec une diminution de l'expression de Nav1.9 dans les DRG et une accumulation au niveau du site de lésion (Coward et al., 2000; Yiangou et al., 2000). Dans des cas de névromes, le niveau d'expression de Nav1.9 au niveau du site de lésion est similaire à celui observé au niveau du nerf controlatéral (Coward et al., 2000; Black et al., 2008). Le canal Nav1.9 n'est pas détectable dans des biopsies de peau issues de zones douloureuses dans des cas de névralgie post-herpétique ou de syndrome régional douloureux complexe, (Zhao et al., 2008).

Expression chez l'animal en conditions inflammatoires : beaucoup de données à ce sujet sont disponibles et de fortes contradictions existent entre les études quant à la surexpression ou non du canal Nav1.9 en conditions inflammatoires. Ces données bibliographiques seront développées dans la partie "Inflammation" de cette thèse (voir chapitre I.3 p. 67). Une synthèse bibliographique de l'expression du canal Nav1.9 en conditions inflammatoires est donnée par le Tableau 4 (p. 69).

Knock-out/knock-down : les animaux KO ou traités par antisens anti-Nav1.9 ne présentent aucun déficit en termes de sensibilité thermique ou mécanique dans la majorité des études (Porreca et al., 1999; Priest et al., 2005; Amaya et al., 2006). Selon ces mêmes études, Nav1.9 ne semble pas non plus être impliqué dans la douleur neuropathique (SNL, CCI, SNI) malgré les perturbations de son expression observées dans les FAP. En revanche, une implication du canal Nav1.9 dans la douleur inflammatoire se dégage des études existantes. En effet, la douleur spontanée ainsi que l'hypersensibilité douloureuse thermique et mécanique provoquée par des injections intraplantaires

Introduction et bases bibliographiques

La transduction nociceptive et le rôle clé des canaux Nav

de médiateurs pro-inflammatoires (prostaglandine E_2 (PGE_2), bradykinine, interleukine 1β ($IL-1\beta$)) sont réduites chez les souris KO Nav1.9 (Amaya et al., 2006). Les résultats obtenus sur les modèles d'inflammation sont moins clairs et des divergences apparaissent, impliquant ou non le canal Nav1.9 dans l'hypersensibilité douloureuse inflammatoire thermique, et ne confirmant pas l'implication du canal dans l'hypersensibilité mécanique observée après injections de médiateurs inflammatoires (Priest et al., 2005; Amaya et al., 2006; Martinez et Melgar, 2008; Leo et al., 2010; Yu et al., 2011). Ce constat est le point de départ de ce travail de thèse et sera développé dans la partie "Inflammation" du manuscrit (voir chapitre I.3 p. 67). Une synthèse des résultats comportementaux obtenus chez les animaux KO ou knock-down Nav1.9 est donnée par le Tableau 5 (p. 71).

Mutations naturelles chez l'Homme : il n'existe pas de mutations connues chez l'Homme de cette sous-unité.

- Le canal Nav1.9 présente un territoire d'expression particulièrement intéressant, restreint aux nocicepteurs. S'il n'est a priori pas impliqué dans la nociception chez les animaux sains, il pourrait représenter une cible pharmacologique intéressante dans le traitement des douleurs inflammatoires. Les résultats existants dans ce sens doivent cependant être clarifiés et une étude exhaustive de l'implication du canal Nav1.9 dans la douleur inflammatoire est nécessaire.



***CONTRIBUTION DU CANAL
NAV1.9 A LA DOULEUR
INFLAMMATOIRE***



I. INTRODUCTION

1. LA REACTION INFLAMMATOIRE

L'inflammation est un système de défense inné, non spécifique, de l'organisme en réponse à une infection (bactérie, virus, champignon, parasite), un agent chimique (toxine, venin) ou à une lésion tissulaire (plaie, brûlure, irradiation). Elle peut aussi être induite par des désordres pathologiques comme un défaut de vascularisation à l'origine d'une nécrose par ischémie, ou une anomalie de la réponse immunitaire (allergie, auto-immunité). Elle est caractérisée dans un premier temps par un accroissement local du flux sanguin et une formation accrue de liquide extracellulaire (exsudat composé d'eau et de protéines plasmatiques) responsable de la formation d'un œdème. C'est la phase vasculaire, qui va permettre l'apport de médiateurs chimiques et immunitaires (anticorps, facteurs de coagulation ou du complément), de diluer les toxines éventuelles, d'augmenter localement la température, d'isoler le foyer inflammatoire par la formation de fibrine (granulome inflammatoire), et de favoriser la diapédèse des leucocytes par ralentissement du courant circulatoire. Ces derniers vont amorcer la seconde phase de l'inflammation : la phase cellulaire. Les polynucléaires (ou granulocytes) sont les premières cellules recrutées et vont générer une réponse non spécifique. Les granulocytes neutrophiles, composante majeure de la population granulocytaire, vont s'attaquer aux agents bactériens ou viraux par phagocytose. Les basophiles et éosinophiles (les seconds étant plutôt activés dans les cas d'infections parasitaires) peuvent aussi être impliqués et sécréter diverses toxines ainsi que des médiateurs inflammatoires comme l'histamine, participant à l'entretien de la phase vasculaire (effets vaso-actifs) et au recrutement cellulaire (effets chimiotactiques). Les mastocytes tissulaires vont contribuer de façon plus importante à ce phénomène via la sécrétion massive et rapide (dégranulation) de nombreux médiateurs, notamment l'histamine et la sérotonine. Les cellules phagocytaires vont ensuite être recrutées (afflux de monocytes circulants et implication des macrophages résidents), contribuant à l'activation des lymphocytes dans le cas où un pathogène est détecté, ainsi qu'à la phase de détersion (élimination des tissus nécrosés, des débris cellulaires, des agents pathogènes restants et de l'exsudat) qui précède la réparation/cicatrisation du tissu.

2. INTEGRATION DE L'ENVIRONNEMENT INFLAMMATOIRE PAR LES FIBRES AFFERENTES PRIMAIRES

Les différentes phases de l'inflammation sont dépendantes de la libération de nombreux facteurs vaso-actifs et chimiotactiques, créant un environnement chimique complexe parfois qualifié de "soupe" inflammatoire. Ces facteurs sont libérés par les cellules lésées, les cellules de la lignée inflammatoire ou immunitaire (granulocytes, mastocytes, monocytes/macrophages, lymphocytes), les cellules de l'endothélium vasculaire, les thrombocytes (plaquettes), et enfin par les terminaisons nerveuses nociceptives elles-mêmes. Ces dernières jouent en effet un rôle crucial dans l'entretien de la réaction inflammatoire ainsi que dans la douleur qui en résulte. La douleur inflammatoire permet d'induire un comportement de protection vis-à-vis de la zone lésée et d'en limiter les mouvements, favorisant ainsi la cicatrisation. Elle est caractérisée par des décharges lancinantes, ainsi que par une hypersensibilité douloureuse en réponse aux stimulations mécaniques et thermiques chaudes. Elle implique l'activation et la sensibilisation des nocicepteurs qui sont en mesure de percevoir, d'intégrer, et de contribuer à l'environnement inflammatoire dans lequel ils projettent. Ceci est rendu possible par l'expression d'un large panel de récepteurs spécifiques de nombreux médiateurs de l'inflammation (deux schémas synthétiques sont donnés par la Figure 17 et la Figure 18) :

- **Les protons, le glutamate, l'adénosine et les phosphates d'adénosines (ADP, ATP) :** relargués dans le milieu extracellulaire par les cellules lésées, ils vont être capables d'activer directement les nocicepteurs via plusieurs récepteurs. Les canaux ioniques senseurs de l'acidité ASIC1-4 (pour "Acid-Sensing Ion Channel) sont les principaux senseurs des protons et s'activent à pH acide (Waldmann, 2001). D'autres canaux (TREK-1, TRPV1) peuvent également être modulés par les protons (Maingret et al., 1999b; Gold et Caterina, 2008). Les canaux de la famille ASIC et TRP sont des canaux cationiques non-sélectifs dont l'ouverture va entraîner une dépolarisation de la cellule, mais aussi une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium à l'origine notamment de l'activation de la PKC (voir Figure 18). Les canaux potassiques TREK-1 et TRAAK (pour "Tandem pore domain weak inward rectifying K⁺ (TWIK) Related Arachidonic Acid-stimulated K⁺ channel") fonctionnent quant à eux "à l'inverse" puisqu'ils vont produire un courant de fond hyperpolarisant, bloqué par une diminution extracellulaire de pH (Sandoz et al., 2009).

Les cellules lésées libèrent également du glutamate, activateur des récepteurs mGluR et iGluR (métabotropique et ionotropiques, respectivement). Les récepteurs mGluR sont classés en 3

groupes, le premier ayant une action excitatrice sur les nocicepteurs, les deux suivant étant inhibiteurs. Les nocicepteurs exprimant en grande majorité des récepteurs de type II et III, le glutamate a globalement un effet inhibiteur sur les nocicepteurs (Carlton et Hargett, 2007).

L'adénosine est le ligand des récepteurs purinergiques métabotropiques P1, et les phosphates d'adénosine activent les récepteurs P2X et P2Y, respectivement ionotropiques et métabotropiques. Les récepteur homomultimériques P2X₃ et hétéromultimériques P2X_{2/3} sont en particulier fortement exprimé par les nocicepteurs et leur rôle dans la douleur inflammatoire a été démontré (Burnstock, 2006; Wirkner et al., 2007). Le couplage des récepteurs métabotropiques P2Y est variable et peu de données sont disponibles sur leur éventuelle implication dans la douleur inflammatoire. On sait cependant que les sous-types P2Y₁ et P2Y₂ favorisent l'excitabilité des FAP qui les expriment via une augmentation du calcium intracellulaire et l'activation de la PKC (Yousuf et al., 2011).

- **Les amines vaso-actives.** L'histamine et la sérotonine sont des amines à effet vasodilatateur sécrétées par les plaquettes (sérotonine) et les mastocytes (histamine + sérotonine). L'histamine va activer le récepteur H1 (seul sous-type exprimé par les nocicepteurs) couplé à une protéine Gq/11 activatrice de la phospholipase C (PLC). Les récepteurs à la sérotonine sont très variés. Les nocicepteurs expriment les sous-types 5-HT_{2A} (5-Hydroxytryptamine, couplage Gq et activation PLC puis PKC), 5-HT₃ (ionotropique) et 5-HT₄ (couplage Gs et activation PKA). Tous vont dans le sens d'une activation ou d'une sensibilisation des nocicepteurs. L'entrée de calcium provoquée par l'ouverture du récepteur-canal 5-HT₃ va également contribuer à la sensibilisation neuronale par activation de la PLC (Millan, 1999).
- **Les kinines** sont issues de la dégradation des kininogènes plasmatiques par la kallibréine. La bradykinine et la kallidine (lysine-bradykinine) sont des peptides de 9 et 10 acides aminés à effet vasodilatateur. Ces deux peptides activent le récepteur B₂ exprimé par les nocicepteurs. Il en résulte une activation de la voie PLC/PKC.
- **Les eicosanoïdes** sont des médiateurs lipidiques dérivés de l'acide arachidonique, lui-même issu de la dégradation des phospholipides membranaires par la phospholipase A2. De ce métabolisme sont issus les prostaglandines, les thromboxanes et les leucotriènes. Les eicosanoïdes activent différents récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) dont certains sont connus pour jouer un rôle dans la sensibilisation des nocicepteurs. C'est le cas notamment des récepteurs EP₁ (couplage Gq) et EP₂ (couplage Gs) à la PGE₂ et du récepteur IP (couplage Gs) à la prostaglandine I₂ (Le Bars et Adam, 2002). Leur activation amène donc à une activation en aval de la PKA ou de la PKC. Les leucotriènes B4 ont aussi été impliqués dans la sensibilisation des nocicepteurs (Martin et al., 1987).

Contribution du canal Nav1.9 à la douleur inflammatoire

Introduction

- **Les cytokines** libérées par de nombreux types cellulaires, immunitaires mais aussi par les cellules de la lignée gliale (Rothman et al., 2009), sont de petites protéines (8 à 50 kDa) à effet pro- ou anti-inflammatoire. Les principales cytokines impliquées dans la sensibilisation nociceptive sont les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et TNF α , dont l'injection locale provoque une hypersensibilité douloureuse (Ozaktay et al., 2002; Meyer et al., 2008). Leur action est largement indirecte, via la stimulation de la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires par les cellules immunitaires (prostaglandines, neurotrophines...), mais certaines études montrent que les cytokines ont également une action sensibilisatrice sur les nocicepteurs, impliquant différentes voies de signalisation dont celle de la PKC (Obreja et al., 2002; Andratsch et al., 2009) ou celle de la p38 (Jin et Gereau, 2006) entraînant notamment une régulation positive des canaux TTX-R.
- **Les neurotrophines** sont synthétisées en contexte inflammatoire par les cellules immunitaires, les cellules structurales (épithéliales, fibroblastiques, musculaires...) et par les neurones. Le NGF, et dans une moindre mesure le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF pour "Brain Derived Neurotrophic Factor") dont le rôle est principalement central, sensibilisent les nocicepteurs par un mécanisme indirect sur les cellules immunitaires (notamment sur la sécrétion d'histamine et de sérotonine par les mastocytes) et par un mécanisme direct via les récepteurs tyrosine kinase TrkA (au NGF) et TrkB (au BDNF). La nature de ces récepteurs implique les neurotrophines dans un processus de sensibilisation à long terme, avec un effet sur l'expression de certains des acteurs majeurs de l'excitabilité neuronale. L'activation du récepteur TrkA (et de la voie de signalisation des protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK) Ras-Raf, de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K), de la PLC et de la p38) augmente l'expression de certains canaux dont Nav1.8 et TRPV1, ou encore la synthèse de BDNF (Ji et al., 2002; Pezet et McMahon, 2006).
- **Le monoxyde d'azote** est produit par la NO synthase dans les cellules inflammatoires, endothéliales vasculaires, ou encore dans les neurones eux-mêmes. Cette petite molécule gazeuse est capable de traverser les membranes cellulaires et va avoir un effet paracrine et autocrine. Elle n'a pas de récepteur propre, mais sa liaison à la guanylyle cyclase va conduire à une modification allostérique de cette dernière et à la production de guanosine monophosphate cyclique (GMPc, Koesling et al., 2004) qui aurait un effet négatif sur l'excitabilité de certains nocicepteurs (Levy et Strassman, 2004). L'effet périphérique du NO est ambivalent puisqu'il a également été montré une augmentation de l'excitabilité des nocicepteurs via l'activation des canaux TRPV1 et TRPA1 (Miyamoto et al., 2009). Enfin le NO joue un rôle indirect important dans la douleur inflammatoire, en tant que modulateur positif

de la réponse inflammatoire (sécrétion de prostaglandines, modification du débit sanguin local... Millan, 1999).

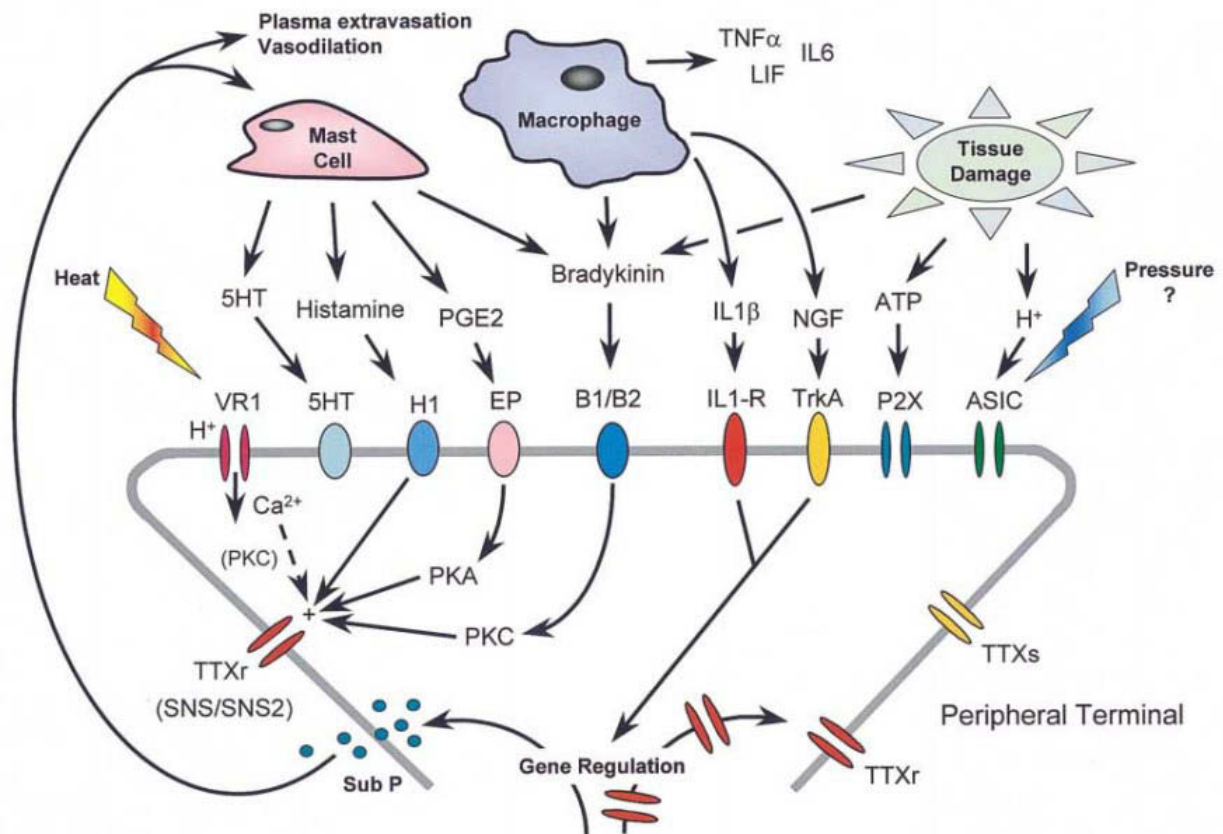


Figure 17. Intégration de l'environnement inflammatoire par les nocicepteurs.

Ce schéma représente les principaux médiateurs de l'inflammation sensibilisant les nocicepteurs ainsi que leurs récepteurs respectifs, décrits dans le chapitre 2. Les voies de signalisation y sont très simplifiées, voir la Figure 18 pour plus de détail (Costigan et Woolf, 2000).

Les nocicepteurs sont donc en mesure d'intégrer l'environnement inflammatoire dans lequel ils baignent, mais vont également y contribuer par la sécrétion de deux **médiateurs peptidiques** (fibres C peptidergiques, TrkA-positives). Le premier, la substance P, est un neuropeptide de 11 acides aminés de la classe des tachykinines qui, outre ses fonctions de neuromédiateur/neuromodulateur, possède un effet vasodilatateur et induit la dégranulation mastocytaire. Le second est le CGRP, un autre peptide vasodilatateur de 37 acides aminés qui va également déclencher la dégranulation des mastocytes. Ces deux peptides vont contribuer à entretenir la réaction inflammatoire mais vont aussi permettre son extension. En effet, suite à l'activation d'une terminaison nociceptive, le message nerveux va pouvoir se propager aux terminaisons voisines par réflexe d'axone et provoquer la libération de substance P et de CGRP. Cette composante à part entière de l'inflammation, dite "neurogène", est responsable d'une zone d'hypersensibilité secondaire entourant le site d'inflammation primaire. De plus, les fibres nociceptives sont activables par la substance P et le CGRP, ce qui donne lieu à une boucle d'auto-activation à la fois directe et indirecte, via les mastocytes. Les récepteurs respectifs de la substance P

Contribution du canal Nav1.9 à la douleur inflammatoire

Introduction

et du CGRP sont les récepteurs NK_1 et le dimère CRL/RAMP1, tous deux métabotropiques et activant respectivement la PKC (via la PLC) et la PKA.

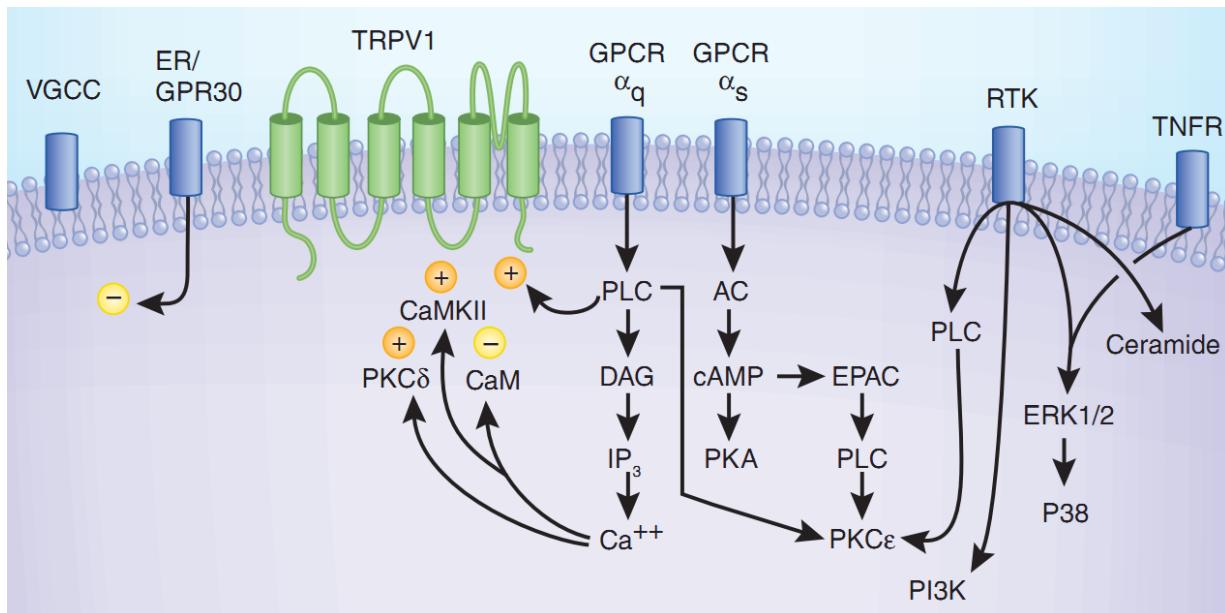


Figure 18. Signalisation impliquée dans la sensibilisation des nocicepteurs par l'inflammation - l'exemple du canal TRPV1.

Le canal TRPV1 est sujet à de nombreuses modulations en contexte inflammatoire, ce qui en fait un exemple intéressant pour l'illustration des voies de signalisations intervenant dans la sensibilisation neuronale. L'activation de récepteurs couplés à une protéine Gq (RCPG α_q) résulte en une sensibilisation du récepteur TRPV1 via la PLC, directement ou via la voie diacylglycérol (DAG)/inositol triphosphate (IP_3) qui aboutit à l'activation de la PKC ϵ et déclenche la libération des stocks vésiculaires de calcium. Ceci va avoir pour conséquence l'activation de la PKC δ et de la protéinase II dépendante du complexe calcium/calmoduline (CaMKII), ayant un effet positif sur l'activation de TRPV1. L'activation d'un récepteur couplé à une protéine Gs (α_s) déclenche quant à elle l'activation de l'adénylate cyclase (AC), qui active la PKA via la production d'AMP cyclique (cAMP). Le facteur d'échange guanine activé par l'AMP cyclique (EPAC) va parallèlement activer la PKC ϵ via la PLC. La PKC ϵ est aussi activable par l'activation de récepteurs tyrosine kinase (RTK) via la PLC. Ceci montre qu'un phénomène de "cross-talk" important existe entre ces voies, et que l'activation de récepteurs différents converge vers des effets communs (notamment l'activation de la PKC ϵ). A ce schéma il faudrait ajouter la régulation positive du canal TRPV1 exercée par les céramides, la protéine kinase activée par des mitogènes (MAPK) p38, la phosphoinositide 3-kinase (PI3K), la PKC ϵ et la PKA (Gold et Gebhart, 2010).

L'action des médiateurs de l'inflammation sur leurs récepteurs respectifs va donc résulter en une excitation directe des neurones via les récepteurs ionotropiques (voir Figure 17), et en une activation de différentes voies de signalisation ayant pour acteurs centraux la PKA et la PKC (voir Figure 18). Ces deux kinases sont connues pour sensibiliser les nocicepteurs, notamment via la phosphorylation de canaux comme Nav1.8 ou TRPV1 (Vijayaragavan et al., 2004; Lee et al., 2005). De nombreuses études montrent de plus des variations de l'expression de ces canaux en contexte inflammatoire (Ji et al., 2002; Black et al., 2004). Le canal Nav1.9, objet de cette thèse, est également soumis à différentes régulations, présentées dans le chapitre suivant.

3. REGULATION DU CANAL NAV1.9 PAR L'INFLAMMATION

En 1996, il a été montré que certains médiateurs pro-inflammatoires comme la PGE₂ avaient un effet positif sur le courant TTX-R enregistré dans les nocicepteurs (attribué aux canaux Nav1.8 et Nav1.9), impliquant une activation de la PKA (England et al., 1996; Gold et al., 1996). L'activation de la PKC, elle aussi recrutée en contexte inflammatoire, permet également d'augmenter le courant TTX-R dans les neurones des DRG (Gold et al., 1998). Il a plus tard été montré que cette régulation positive du courant TTX-R par ces deux kinases était sous-tendue le canal Nav1.8 (Vijayaragavan et al., 2004). Cependant, de nombreuses études montrent que le canal Nav1.9 est lui aussi soumis à ces régulations. En effet, l'activation constitutive des RCPG par le GTPγS (analogue non hydrolysable de la guanosine triphosphate, ou GTP) entraîne une augmentation du courant Nav1.9 via un déplacement de son seuil d'activation vers des potentiels plus négatifs (Baker et al., 2003; Ostman et al., 2008). L'effet est maximal au bout de 5 min, excluant un impact sur l'expression du canal, et peut être bloqué par un inhibiteur de PKC mais pas par un inhibiteur de la PKA (Baker, 2005). L'effet du GTPγS peut être reproduit en activant directement la PKC par un analogue du diacylglycérol, ou par l'ATP extracellulaire (impliquant potentiellement une activation des récepteurs P2Y). La PGE₂ n'a pas d'effet aigu (5 min d'incubation à 5 μM), mais une autre étude montre une augmentation du courant Nav1.9 par la PGE₂ (10 μM) après 1 h d'incubation, toujours via un déplacement de son potentiel d'activation vers des valeurs plus hyperpolarisées (Rush et Waxman, 2004). Dans une étude plus récente, François Maingret et al. (2008) montrent finalement que si de faibles concentrations de médiateurs pro-inflammatoires (bradykinine, PGE₂, histamine, noradrénaline et ATP) n'ont aucun effet sur le courant Nav1.9 individuellement, l'application concomitante de tous ces médiateurs (à des concentrations inférieures) a un effet similaire à celui du GTPγS. Les auteurs proposent que le canal Nav1.9 est soumis à des régulations provenant de différentes voies de signalisation intracellulaires (notamment par la PKA et la PKC), et que la convergence de ces dernières a un effet additif sur l'activité du canal, lui conférant un rôle de "détecteur de coïncidence"¹⁶.

Une régulation semblable peut également être obtenue par dialyse d'ions fluorure dans la cellule (Coste et al., 2004; Maruyama et al., 2004). Bertrand Coste et al (2004) ont montré que ce type de modulation du courant Nav1.9 avait un impact important sur l'excitabilité des nocicepteurs. Le fait

¹⁶ La détection de coïncidence est le principe selon lequel un neurone (ou un circuit neuronal) est capable d'intégrer l'occurrence simultanée de plusieurs signaux d'origines distinctes. A l'échelle moléculaire, le récepteur au N-méthyl-D-aspartate est un exemple caractéristique puisqu'il nécessite d'être activé de manière concomitante par la liaison de glutamate et par la dépolarisation de la membrane.

Contribution du canal Nav1.9 à la douleur inflammatoire

Introduction

que le canal Nav1.9 soit ouvert à des potentiels inférieurs au potentiel d'émission des PA permet la génération de dépolarisations régénératives qui, en s'ajoutant à des dépolarisations infraliminaires, vont permettre au neurone d'atteindre le seuil d'émission des PA. La persistance du courant Nav1.9 permet la génération de longs plateaux dépolarisants (-40 à -50 mV) sur lesquels vont pouvoir se greffer plusieurs PA. Ceci confère aux nocicepteurs un comportement "bistable" caractérisé par l'alternance entre des décharges en bouffées (sous-tendues par le courant Nav1.9 persistant) et un état silencieux (suite à l'inactivation lente des canaux Nav1.9). Ce type de comportement n'est pas observé dans des neurones Nav1.9^{-/-} (Maingret et al., 2008). Le couple Nav1.9/Nav1.8 serait donc la clé de voute de l'excitabilité des nocicepteurs, jouant deux rôles complémentaires (amplificateur/effecteur) dans l'hyperexcitabilité induite par l'inflammation.

Outre les multiples modulations rapides présentées dans ce chapitre, le canal Nav1.9 subit également, dans certaines conditions inflammatoires, une modulation de son expression. Plusieurs études ont porté sur l'expression du canal Nav1.9 en contexte inflammatoire. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 4. Les données, obtenues principalement chez des modèles d'inflammation plantaire (carragénine ou CFA), sont contradictoires et montrent tour à tour une expression stable ou augmentée du canal. La diversité des techniques utilisées (northern blot, western blot, immunohistochimie, hybridation *in situ*, qPCR et RT-PCR), comme celle des cinétiques considérées, ne permet pas d'avoir une image claire de la régulation de l'expression du canal Nav1.9 par l'inflammation.

Contribution du canal Nav1.9 à la douleur inflammatoire

Introduction

Modèle		Temps	Observations (dans les DRG sauf précision)	Références					
Carragénine intraplantaire (souris)		4 heures	= ARNm	(Yen et al., 2009)					
		2 jours	↑ ARNm						
		7 jours	= ARNm						
Carragénine intraplantaire (rat)		4 jours	= ARNm	(Black et al., 2004)					
			= protéine						
Carragénine intramusculaire (souris)		2 jours	= ARNm	(Yen et al., 2009)					
CFA intraplantaire (souris)		3 jours	↑ protéine	(Amaya et al., 2006)					
CFA intraplantaire (souris)		2 jours	= ARNm	(Yen et al., 2009)					
CFA intramusculaire (souris)		2 jours	= ARNm						
CFA intraplantaire (rat)		1 jour	↑ ARNm	(Yu et al., 2011)					
			↑ protéine						
CFA intraplantaire (rat)		2 jours	↓ protéine (axones)	(Coggeshall et al., 2004)					
CFA intraplantaire (rat)		2 jours	= ARNm	(Tate et al., 1998)					
		7 jours	↑ ARNm						
Monoarthrite (genou, souris)		14 jours	↑ protéine (dans les neurones innervant la zone enflammée)	(Strickland et al., 2008)					
		21 jours							
		28 jours							
Temps		4 h	2 j	3 j	4 j	7 j	14 j	21 j	28 j
carra.	ARNm	=	↑		=	=			
	protéine				=				
CFA	ARNm		= =			↑			
	protéine		↓ *	↑			↑ \$	↑ \$	↑ \$

Tableau 4. Synthèse bibliographique des études de l'expression de Nav1.9 chez des modèles animaux d'inflammation.

La partie supérieure du tableau présente les différentes études publiées et leurs résultats. La partie inférieure résume ces résultats de manière cinétique. Les signes ↑, = et ↓ indiquent respectivement une augmentation, une stabilité ou une diminution de l'expression. Les signes en bleu correspondent à des études réalisées chez la souris, et en rouge chez le rat. * expression au niveau axonal ; \$ modèle de monoarthrite.

Contribution du canal Nav1.9 à la douleur inflammatoire

Introduction

Depuis quelques années, des données comportementales concernant l'implication du canal Nav1.9 dans la douleur inflammatoire viennent compléter les données cellulaires et moléculaires (voir le Tableau 5 pour un résumé complet de ces études). Les souris KO Nav1.9 montrent en effet une diminution de l'hypersensibilité aux stimulations mécaniques et thermiques chaudes en réponse à l'injection intraplantaire de médiateur pro-inflammatoires (PGE₂, bradykinine, IL-1 β , Amaya et al., 2006). Ces animaux montrent également une réduction de la douleur inflammatoire spontanée ressentie en réponse à une injection intraplantaire de formol (Priest et al., 2005; Leo et al., 2010). Les résultats obtenus avec des modèles d'inflammation plus proches de la clinique (*i.e.* pour lesquels une réaction inflammatoire complète, et plus ou moins durable, est induite) sont moins clairs. En effet, aucune étude n'a permis de confirmer l'implication du canal Nav1.9 dans l'hypersensibilité mécanique observée suite à l'injection intraplantaire de médiateurs pro-inflammatoires (toutes les études étant réalisées sur le même modèle de CFA intraplantaire). Une étude chez des animaux modèle d'inflammation colique (activation du Toll Like Receptor 7 par instillation de R-848) montre cependant une diminution de l'hypersensibilité viscérale d'animaux KO Nav1.9 en réponse au test de distension colorectale (Martinez et Melgar, 2008). La contribution du canal Nav1.9 dans l'hypersensibilité au chaud fait également débat puisque seule la moitié des études montre son implication dans ce symptôme suite à une injection intraplantaire de carragénine ou de CFA (Priest et al., 2005; Amaya et al., 2006; Leo et al., 2010; Yu et al., 2011).

	Pression	Chaud	Autre
Sensibilité chez l'animal sain			
Seuils de douleur	= seuil de douleur ^{1,2,3} <u>ou</u> ↓ seuil de douleur ⁵	= seuil de douleur ^{1,2,3,5}	= seuil de douleur au froid ³ = seuil de douleur à la distension colorectale ⁴
Agonistes de canaux transducteurs			
Capsaïcine intraplantaire	↓ hypersensibilité ³		↓ léchage de la patte ³
αβ-met-ATP intraplantaire		↓ hypersensibilité ³	
UTP intraplantaire		↓ hypersensibilité ³	
NGF intraplantaire	= hypersensibilité ³	= hypersensibilité ³	
Douleur inflammatoire			
Médiateurs pro-inflammatoire			
PGE ₂ intraplantaire	↓ hypersensibilité ³	↓ hypersensibilité ^{2,3}	
PGE ₂ intrathécale	= hypersensibilité ³	= hypersensibilité ³	
Bradykinine intraplantaire	↓ hypersensibilité ³	↓ hypersensibilité ³	↓ léchage de la patte ³
IL-1β intraplantaire	↓ hypersensibilité ³	↓ hypersensibilité ³	
Modèles d'inflammation			
Formol intraplantaire			↓ léchage de la patte ² ou des sursauts ⁵ pendant la phase inflammatoire
Carragénine intraplantaire		= hypersensibilité ⁵ <u>ou</u> récupération plus rapide ²	
CFA intraplantaire	= hypersensibilité ^{2,3,5,6}	= hypersensibilité ^{5,6} <u>ou</u> ↓ hypersensibilité ^{2,3}	
Instillation rectale de R-848			↓ hypersensibilité viscérale (distension) ⁴
Acide acétique intrapéritonéal			↑ nombre de crampes ⁵
Douleur neuropathique			
SNL*	= hypersensibilité ¹	= hypersensibilité ¹	
CCI*	= hypersensibilité ^{2,5}		↓ hypersensibilité au froid ⁵
SNI*	= hypersensibilité ^{3,5}		= hypersensibilité au froid ³ <u>ou</u> ↓ hypersensibilité au froid ⁵

Tableau 5. Synthèse bibliographique des études comportementales chez la souris KO Nav1.9 ou le rat knock-down.

Les résultats contradictoires sont marqués en rouge. ¹(Porreca et al., 1999) ²(Priest et al., 2005) ³(Amaya et al., 2006) ⁴(Martinez et Melgar, 2008) ⁵(Leo et al., 2010) ⁶(Yu et al., 2011). Les articles 1 et 6 sont réalisés chez le rat après knock-down. Les articles 2, 3, 4 et 5 sont réalisés chez la souris KO. *Ces modèles de neuropathie traumatique sont rappelés dans la Figure 15 p. 48.

II. OBJECTIFS

La bibliographie nous fournit des données électrophysiologiques, moléculaires/cellulaires et comportementales proposant l'implication du canal Nav1.9 dans la douleur inflammatoire. Cependant, le manque de cohérence entre ces études (modèles, techniques, cinétiques...) rend difficile toute corrélation, et les divergences existant entre les résultats publiés ne permettent pas l'émergence d'un consensus. Ce travail de thèse a pour but de fournir une étude plus complète de l'implication du canal Nav1.9 dans la douleur inflammatoire aiguë à chronique, permettant pour la première fois la corrélation de données comportementales, cellulaires et électrophysiologiques acquises sur les mêmes modèles, et selon les mêmes cinétiques. Nous espérons pouvoir ainsi caractériser avec précision l'implication du canal Nav1.9 dans la douleur inflammatoire, mais aussi avoir des éléments concrets permettant d'interpréter les différents types de régulation auxquels est soumis le canal Nav1.9 dans ces conditions (expression, fonctionnalité).

Dans ce but, 3 modèles d'inflammation, allant du mode aiguë à chronique, sont induits chez des souris KO Nav1.9. La sensibilité douloureuse au chaud de ces animaux est évaluée de manière cinétique tout au long du développement de l'inflammation. De la même manière, la sensibilité mécanique est évaluée à l'aide d'un test de douleur provoquée (von Frey, comme classiquement utilisé dans les études existantes) mais aussi d'un test de douleur spontanée (Dynamic Weight Bearing, permettant l'évaluation de la distribution pondérale des animaux). Une validation des observations réalisées est de plus effectuée chez le rat suite à un knock-down de Nav1.9 par stratégie antisens. Sur ces mêmes modèles d'inflammation, une étude de l'expression transcriptionnelle et protéique du canal est menée dans les DRG par qPCR et immunohistochimie. La quantité de canaux est également évaluée au niveau des terminaisons nerveuses. Enfin, les propriétés électrophysiologiques du canal Nav1.9 sont analysées par patch clamp dans les nocicepteurs innervant la zone enflammée (identifiés par marquage rétrograde).

III. RESULTATS

1. DONNEES COMPORTEMENTALES

1.1. Inflammation aiguë

Dans le but de réaliser un premier phénotypage de notre souche de souris KO Nav1.9, nous avons tout d'abord souhaité reproduire le test au formol publié par Birgit Priest et al. (2005), montrant une réduction de la douleur spontanée chez des souris KO Nav1.9 lors de la réaction inflammatoire qui suit une injection intraplantaire de formol. Cette injection est connue pour induire une réponse comportementale biphasique caractérisée par le léchage de la patte, la première phase (0-5 min) étant liée à une activation directe des fibres nociceptives par le formol, la seconde (10-45 min) étant la phase de douleur inflammatoire aiguë spontanée. Nous observons bien chez nos souris KO Nav1.9 une diminution du comportement de léchage seulement dans la deuxième phase du test (voir Figure 19A), impliquant le canal Nav1.9 dans la douleur inflammatoire aiguë spontanée. Ce rôle du canal Nav1.9 peut de plus être étendu aux territoires à innervation trigéminal, puisqu'un résultat similaire est obtenu suite à l'injection de formol dans la lèvre supérieure (voir Figure 19B). Ceci est en accord avec l'expression du canal dans les petites fibres du ganglion trigéminal ainsi que dans les terminaisons nerveuses des lèvres chez la souris (Padilla et al., 2007).

Contribution du canal Nav1.9 à la douleur inflammatoire

Résultats

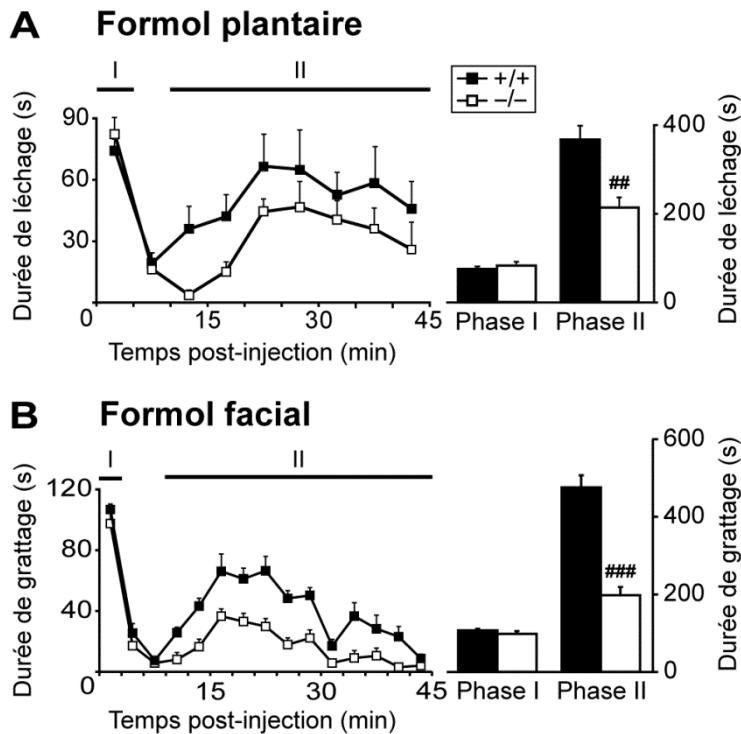


Figure 19. Evaluation de la douleur inflammatoire aiguë spontanée chez les souris KO Nav1.9.

Une inflammation aiguë est induite chez des souris sauvages et KO Nav1.9 par injection de 15 μ l de formaldéhyde 5% au niveau de la patte arrière droite (formol plantaire, A), ou de 10 μ l de formaldéhyde 2% dans la lèvre supérieure droite (formol facial, B). La durée de léchage de la patte (A) ou de grattage facial (B) est chronométrée par tranches de 5 min (A) ou 3 min (B) pendant 45 min. Une sommation du temps de léchage est réalisée pendant les deux phases caractéristiques du test, la phase I, non-inflammatoire (A : 0-5 min ; B : 0-3 min), et la phase II, inflammatoire (A : 10-45 min ; B : 9-45 min). ## $p < 0,01$ ### $p < 0,001$ vs '+/+', t-test, n=8. L'expérience de formol facial a été menée à l'U929 INSERM avec l'aide du Pr Philippe Luccarini.

1.2. Inflammation subaiguë

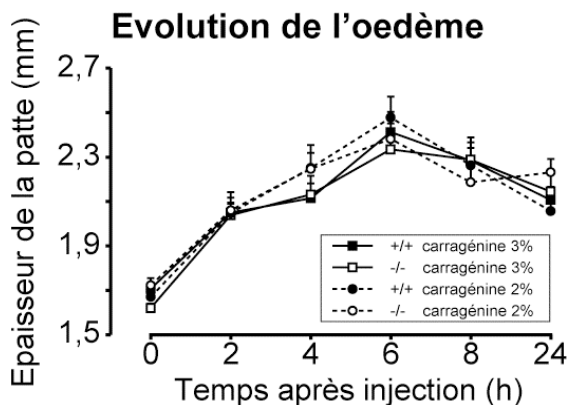


Figure 20. Evolution de l'œdème induit par injection intraplantaire de carragénine 2 et 3% chez des souris sauvages et KO Nav1.9.

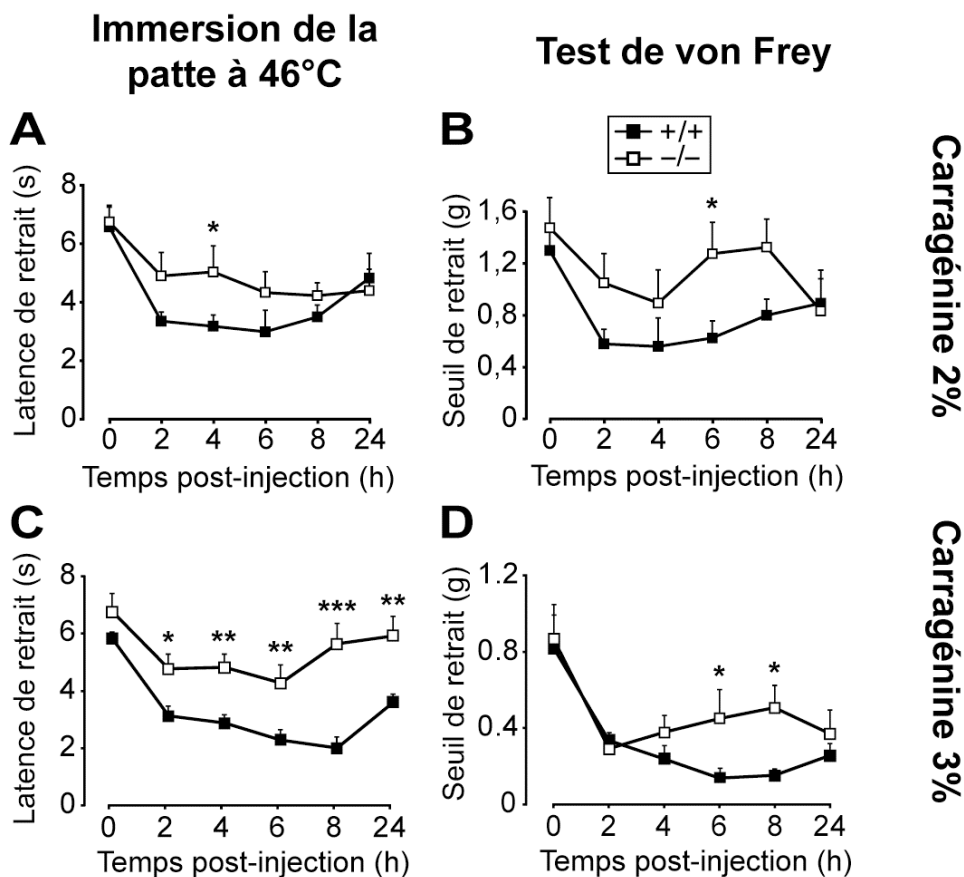
L'épaisseur de la patte enflammée est mesurée avant et 2, 4, 6, 8 et 24 h après injection intraplantaire de carragénine 2% (ronds) et 3% (carrés) chez des souris sauvages et KO Nav1.9. two way ANOVA, n=8 (carragénine 2%) et n=9 (carragénine 3%)

Une inflammation subaiguë est induite chez des souris sauvages (WT pour "wild-type") et KO Nav1.9 par injection intraplantaire de λ -carragénine 2 ou 3% (polysaccharide extrait d'algues rouges). Quelle que soit la concentration de carragénine injectée, on note l'apparition d'un œdème dès 2 h post-injection, avec un gonflement maximal à 6 h post-injection (voir Figure 20). L'œdème est toujours présent à 24 h et sa taille n'est à aucun moment dépendante de la concentration de carragénine injectée.

Les animaux sont soumis à deux tests de sensibilité mécanique et thermique chaude. Le test

de von Frey (voir Figure 21A,C) permet de définir le seuil de douleur des animaux en réponse à une stimulation mécanique (application sous-plantaire de filaments calibrés permettant d'apprécier le seuil de douleur en grammes). Le test d'immersion de la patte à 46°C (voir Figure 21B,D) permet quant

à lui de déterminer le seuil de douleur en réponse à une stimulation thermique chaude (le seuil est défini en secondes par la latence de retrait de la patte immergée dans de l'eau thermostatée).



Carragénine 2%
Carragénine 3%

Figure 21. Impact du KO Nav1.9 sur la sensibilité thermique et mécanique de souris après injection intraplantaire de carragénine 2 et 3%. Des souris WT et KO Nav1.9 sont soumises au test d'immersion de la patte à 46°C (A,C) et au test de von Frey (B,D) avant et 2, 4, 6, 8 et 24 h après injection de carragénine 2% (A-B) et 3% (C, D). Cut-off=15 s (A,C) et 2 g (B,D). *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 vs '+/+', two way ANOVA + Student-Newman-Keuls, n=8 (A-B) et n=9 (C-D)

Nous observons tout d'abord que la délétion du gène codant le canal Nav1.9 n'a pas d'impact sur les seuils de douleur avant injection (temps 0), et ce quelle que soit la modalité de stimulation testée. Suite à l'injection intraplantaire de carragénine 2 ou 3%, une hypersensibilité thermique et mécanique apparaît chez les souris, caractérisée par la diminution des seuils de réponse aux deux tests. La diminution maximale des seuils de douleur est atteinte entre 6 et 8 h (à l'exception de l'hypersensibilité mécanique dans le modèle carragénine 2%) et reste significative jusqu'à 24 h, suivant la cinétique d'évolution de l'œdème. L'hypersensibilité observée est cependant réduite chez les souris KO Nav1.9, sur le plan thermique comme mécanique. Ceci est visible pour les deux doses de carragénine utilisées, mais plus marqué pour la dose de 3% qui sera utilisée pour les expériences ultérieures.

Contribution du canal Nav1.9 à la douleur inflammatoire

Résultats

L'implication du canal Nav1.9 dans l'hypersensibilité mécanique n'ayant encore jamais été démontrée, nous avons décidé de vérifier cette observation par un nouveau test indépendant de l'expérimentateur. Le test du Dynamic Weight Bearing consiste à mesurer pendant 5 min la pression appliquée par une souris en champ libre sur ses 4 membres de manière à évaluer sa distribution pondérale. Suite à l'injection intraplantaire de carragénine 3%, nous suivons l'évolution de plusieurs paramètres que sont le ratio de poids ipsi/controlatéral (sur les pattes arrières dont une est injectée, voir Figure 22A), le pourcentage de temps passé avec la patte enflammée en suspension (voir Figure 22B), et le poids appliqué sur les pattes avant ipsilatérales et controlatérales (voir Figure 22A et B, respectivement). Nous observons chez les souris WT

Dynamic Weight Bearing (distribution pondérale)

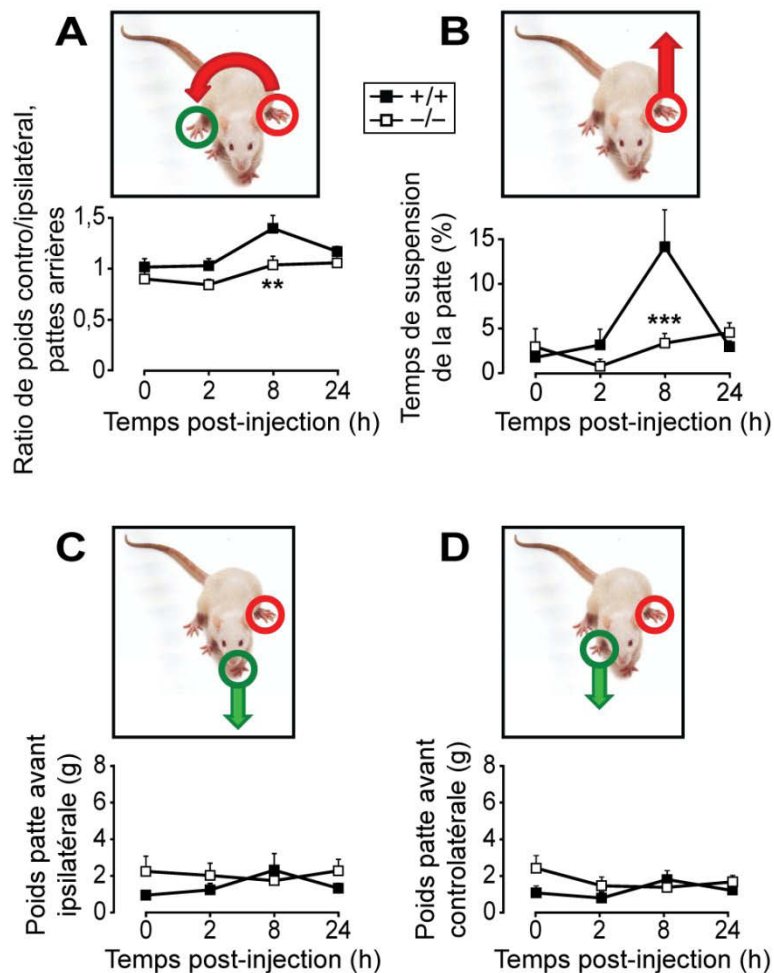


Figure 22. Effet d'une inflammation plantaire subaiguë sur la distribution pondérale de souris WT et KO Nav1.9.

Des souris WT et KO Nav1.9 sont soumises au test du Dynamic Weight Bearing avant et 2, 8 et 24 h après injection intraplantaire de carragénine 3%. Les résultats présentés concernent le ratio de poids controlatéral/ipsilatéral arrière (A), le pourcentage de temps passé avec la patte enflammée en suspension (B), et le poids appliqué sur les pattes avant ipsilatérale (C) et controlatérale (D). ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ vs '+/+', two way ANOVA + Student-Newman-Keuls, $n = 5$

une augmentation du ratio de poids contro/ipsilatéral arrière ($p = 0,014$) ainsi que du temps passé avec la patte arrière en suspension ($p < 0,001$) à 8 h, temps pour lequel les seuils de douleur mesurés par le test de von Frey sont les plus bas. Ce déséquilibre pondéral n'est pas retrouvé chez les souris KO Nav1.9, dont les deux paramètres évoqués sont significativement réduits à 8 h post-injection. Nous n'observons aucun report de poids sur les pattes avant des animaux, quel que soit le génotype. Les résultats du Dynamic Weight Bearing vont dans le sens des observations réalisées grâce au test de von Frey, et confirment l'implication du canal Nav1.9 dans l'hypersensibilité douloureuse mécanique induite par une inflammation plantaire subaiguë.

Il est reconnu que des phénomènes compensatoires peuvent apparaître chez certaines souches d'animaux transgéniques, perturbant l'expression de gènes non ciblés. Il a par exemple déjà été observé chez des souris KO Nav1.8 une augmentation de l'intensité des courants TTX-S par rapport aux WT (Akopian et al., 1999). Nous avons donc voulu valider les résultats acquis chez la souris KO en utilisant une approche différente, par knock-down de Nav1.9 chez le rat (Porreca et al., 1999). Ceci consiste en 6 injections intrathécales de 12,5 µg d'ODN antisens (ou d'ODN dont la séquence n'est spécifique d'aucun transcrite connu, appelée "mismatch", ou bien encore du véhicule seul) espacées chacune de 12 h (voir Figure 24A). Plusieurs études ont montré que les ODN administrés par voie intrathécale diffusaient bien au niveau des DRG avoisinant le site d'injection et ne pénétraient pas la moelle épinière, retenus par les méninges (Lai et al., 2002; Bourinet et al., 2005). L'efficacité de notre traitement dans les DRG a été évaluée par immunohistochimie. L'utilisation d'un anticorps commercial anti-Nav1.9 (Alomone #ASC-017) a permis de mettre en évidence la diminution de l'expression du canal Nav1.9 dans les DRG L4 à L6 de manière qualitative (voir Figure 23A-C). Cependant, un marquage nucléaire est observé dans certaines cellules, mettant en doute la spécificité de cet anticorps. Nous avons alors réalisé une deuxième série de marquages en utilisant un anticorps développé à l'UMR CNRS 6231 (clone L23, Padilla et al., 2007) qui a permis de confirmer la diminution d'expression du canal Nav1.9 dans les DRG d'animaux ayant reçu un traitement antisens.

Immunohistochimie α-Nav1.9, validation knock-down

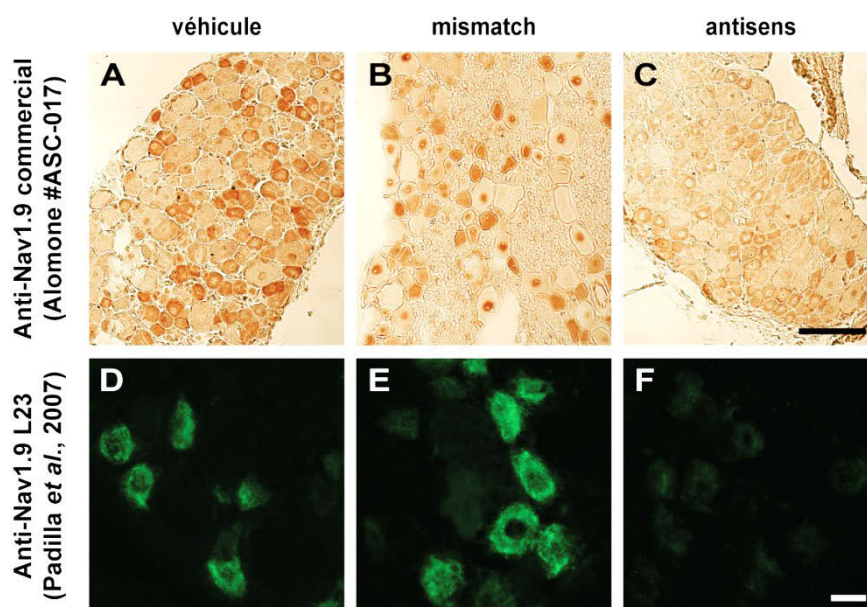


Figure 23. Validation du knock-down chez le rat par immunohistochimie.

Des rats ont reçu 6 injections intrathécales d'ODN antisens (C,F), mismatch (B,E) ou de véhicule (A,D), espacées chacune de 12 h. 5 h après la dernière injection intrathécale les animaux sont sacrifiés et les DRG L4 à L6 prélevés pour immunohistochimie anti-Nav1.9. Deux anticorps différents sont utilisés, un anticorps commercial (#ASC017, Alomone, A-C) et un anticorps produit par l'UMR CNRS 6231 (clone L23, Padilla et al., 2007, D-F), couplés à un marquage peroxydase et un marquage fluorescent, respectivement.

Contribution du canal Nav1.9 à la douleur inflammatoire

Résultats

L'effet du traitement antisens sur les seuils de douleur de rats présentant une inflammation plantaire subaiguë est alors évalué. Avant et après traitement, les seuils de douleur thermique et mécanique sont appréciés par les tests d'immersion de la patte à 46°C (voir Figure 24B) et de pression de la patte (voir Figure 24C, test de Randall & Selitto, consistant à appliquer une pression croissante sur la patte de l'animal jusqu'au retrait ou à la vocalisation de ce dernier). Suite à ces tests, l'inflammation est induite par injection intraplantaire de carragénine 3%, suivie d'une nouvelle série de tests 4 h plus tard. Nous n'observons aucune modification des seuils de douleur au chaud et à la pression suite au traitement antisens, comme observé chez les souris KO Nav1.9. 4 h après induction d'une inflammation plantaire, une hypersensibilité douloureuse est observée chez les animaux des groupes "mismatch" et "véhicule". Chez les animaux ayant reçu des antisens, cette hypersensibilité est significativement diminuée, et même abolie en ce qui concerne la modalité thermique. Ces résultats nous permettent de confirmer que le canal Nav1.9 est bien lui-même impliqué dans les phénomènes d'hypersensibilité thermique et mécanique observés lors d'une inflammation subaiguë.

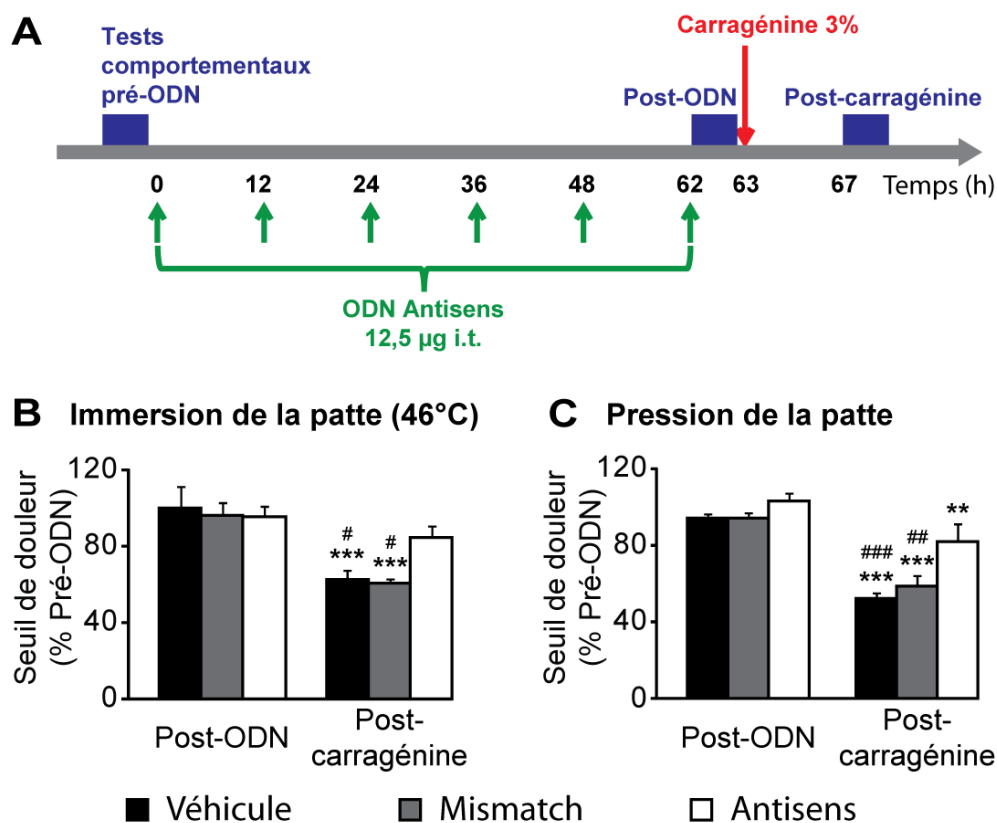


Figure 24. Impact du knock-down Nav1.9 sur l'hypersensibilité douloureuse inflammatoire chez le rat.

(A) Un knock-down de Nav1.9 a été réalisé chez le rat par 6 injections d'ODN antisens (12,5 µg) espacées chacune de 12 h. Deux autres groupes d'animaux reçoivent des injections d'ODN mismatch ou de véhicule en parallèle. Les animaux sont soumis au test d'immersion de la patte à 46°C et au test de pression de la patte avant knock-down et immédiatement après la dernière injection d'ODN. Suite à ces derniers tests, les animaux reçoivent une injection intraplantaire de carragénine 3%. Une dernière série de tests comportementaux est enfin réalisée 4 h après induction de l'inflammation. Les résultats des tests d'immersion de la patte à 46°C et de pression de la patte sont représentés en B et C, respectivement, et les valeurs sont exprimées en pourcentages par rapport aux seuils obtenus avant les injections d'ODN. Cut-off=15s (B) et 450 g (C). **p<0,01 ***p<0,001 vs 'Post-ODN', #p<0,05 ###p<0,01 ####p<0,001 vs 'Antisens', two way ANOVA + Student-Newman-Keuls, n=8

1.3. Inflammation chronique (monoarthrite)

Nous avons ensuite voulu savoir dans quelle mesure le canal Nav1.9 participait à l'hypersensibilité douloureuse lors d'une pathologie inflammatoire chronique. Nous avons pour cela choisi un modèle murin de monoarthrite induite par deux injections périarticulaires de CFA (Chillingworth et Donaldson, 2003). Ce modèle a été validé par tomographie par émission de positons suite à une injection intraveineuse de ^{18}F -Fluorodésoxyglucose (voir Figure 25). L'incorporation de ce marqueur radioactif est liée à l'activité métabolique cellulaire (consommation de glucose) et il est admis que l'inflammation associée à une pathologie arthritique augmente sa fixation chez la souris comme chez l'Homme (Matsui et al., 2009; Imler et al., 2010). 10 jours après induction de la monoarthrite chez deux souris WT, nous observons une activité métabolique environ deux fois plus élevée au niveau de la cheville ipsilatérale qu'au niveau de la cheville controlatérale (ratios ipsi/controlo de l'activité surfacique mesurée en cpm/g : 2,15 chez l'animal n°1 ; 1,81 chez l'animal n°2). L'inflammation ne s'est pas propagée aux autres articulations. Suite à l'induction de la monoarthrite, nous observons également le développement d'un œdème dont l'intensité est équivalente entre les souris WT et KO Nav1.9 (voir Figure 26). L'œdème est maximal à 7 jours, et est toujours présent au 21^{ème} jour du protocole.

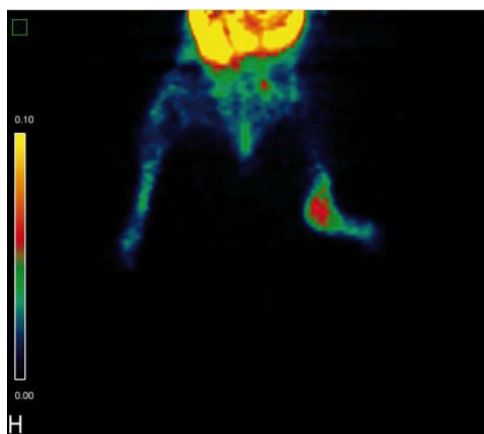


Figure 25. Visualisation de l'activité métabolique au niveau de l'articulation tibio-tarsale chez la souris monoarthritique.

L'activité métabolique est évaluée par incorporation de ^{18}F -fluorodésoxyglucose et tomographie par émission de positons 10 jours après induction de la monoarthrite. L'accumulation du radiotracer au niveau de la cheville ipsilatérale (ici à droite) est 1,8 fois plus marquée que dans la cheville controlatérale de l'animal (ratios de l'activité surfacique en cpm/g). Expérience réalisée à l'UMR 990 INSERM/UdA par le Dr Elisabeth Miot-Noirault.

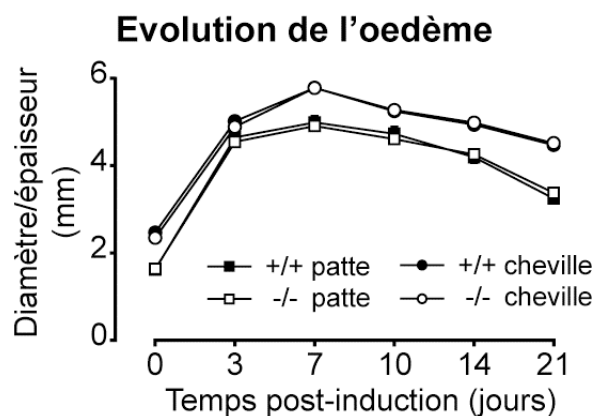


Figure 26. Evolution de l'œdème induit par la monoarthrite chez les souris WT et KO Nav1.9.

Le diamètre de la cheville (ronds) et l'épaisseur de la patte (carrés) enflammée sont mesurés avant et 3, 7, 10, 14 et 21 jours après induction de la monoarthrite chez des souris WT et KO Nav1.9. two way ANOVA, n=8

Contribution du canal Nav1.9 à la douleur inflammatoire

Résultats

Les animaux monoarthritiques ont été soumis au test d'immersion de la patte à 46°C (voir Figure 27). Une diminution de la latence de retrait est observée dès le 3^{ème} jour et reste significative jusqu'au 21^{ème} jour ($p < 0,007$ de J3 à J21 chez les WT). Cette hypersensibilité douloureuse au chaud est réduite chez les souris KO Nav1.9 aux jours 3 et 7 seulement, mais la différence globale sur toute l'expérience reste significative si l'on considère les aires sous la courbe (AUC). Un traitement quotidien par injection intrapéritonéale d'indométacine (1 mg/kg) permet d'obtenir un résultat similaire à ce qui est observé chez les souris KO, y compris sur le plan cinétique.

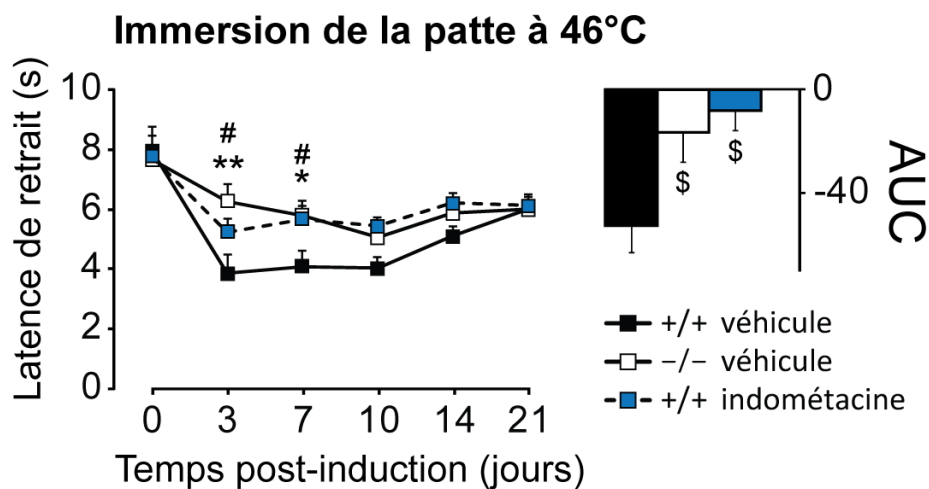


Figure 27. Effet du KO Nav1.9 sur la sensibilité thermique de souris monoarthritiques.

Des souris WT et KO Nav1.9 sont soumises au test d'immersion de la patte à 46°C avant et 3, 7, 10, 14 et 21 jours après induction d'une monoarthrite. Un troisième groupe de souris WT est traité par injection intrapéritonéale quotidienne d'indométacine pendant toute la durée de l'expérience (la première injection ayant lieu avant l'induction de la monoarthrite). Les deux premiers groupes reçoivent en parallèle le véhicule. Les aires sous la courbe sont représentées par les barres de données (AUC). Cut-off=15 s. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ '-/- véhicule' vs '+/+ véhicule', # $p < 0,05$ '+/+ indométacine' vs '+/+ véhicule', two way ANOVA + Student-Newman-Keuls ; \$ $p < 0,05$ vs '+/+ véhicule', one way ANOVA + Bonferroni vs '+/+ véhicule', $n=8$

La douleur mécanique a été évaluée par le test de von Frey mais ce test s'est révélé non compatible avec ce modèle. En effet, le foyer de l'inflammation est localisé au niveau de la cheville, comme montré par imagerie métabolique, et pas au niveau plantaire qui est la région stimulée par le test de von Frey. Si l'œdème diffuse également au niveau plantaire, comme montré par la Figure 26, nous avons plutôt observé une tendance à l'hyposensibilité certainement biaisée par la difficulté des animaux à solliciter l'articulation de la cheville¹⁷. Le test du Dynamic Weight Bearing permettant l'évaluation de la douleur articulaire spontanée s'est révélé bien plus adapté au modèle de monoarthrite.

¹⁷ Ce biais n'a pas été observé dans le test d'immersion de la patte. Dans ce test, la position de la souris en contention, patte tendue, résulte en un réflexe de retrait impliquant une flexion de la hanche et du genou, alors que l'alignement de la cheville est conservé.

Suite à l'induction de la monoarthrite, la distribution pondérale des souris a été fortement modifiée, bien plus que ce qui a été observé pour le modèle d'inflammation plantaire à la carragénine. Le ratio de poids ipsi/controlatéral (voir Figure 28A) est passé de $1,0 \pm 0,0$ (jour 0) à $55,7 \pm 17,9$ au jour 7 chez les WT, temps correspondant à l'acmé de la courbe. Les souris KO Nav1.9 présentent un ratio de poids significativement moins perturbé ($22,2 \pm 7,9$ au jour 7). La différence est également visible sur le temps de suspension de la patte (voir Figure 28B), qui atteint $93,2 \pm 1,5\%$ chez les souris WT contre $71,2 \pm 7,2\%$ chez les KO. Enfin, la douleur ressentie pousse également

Dynamic Weight Bearing (distribution pondérale)

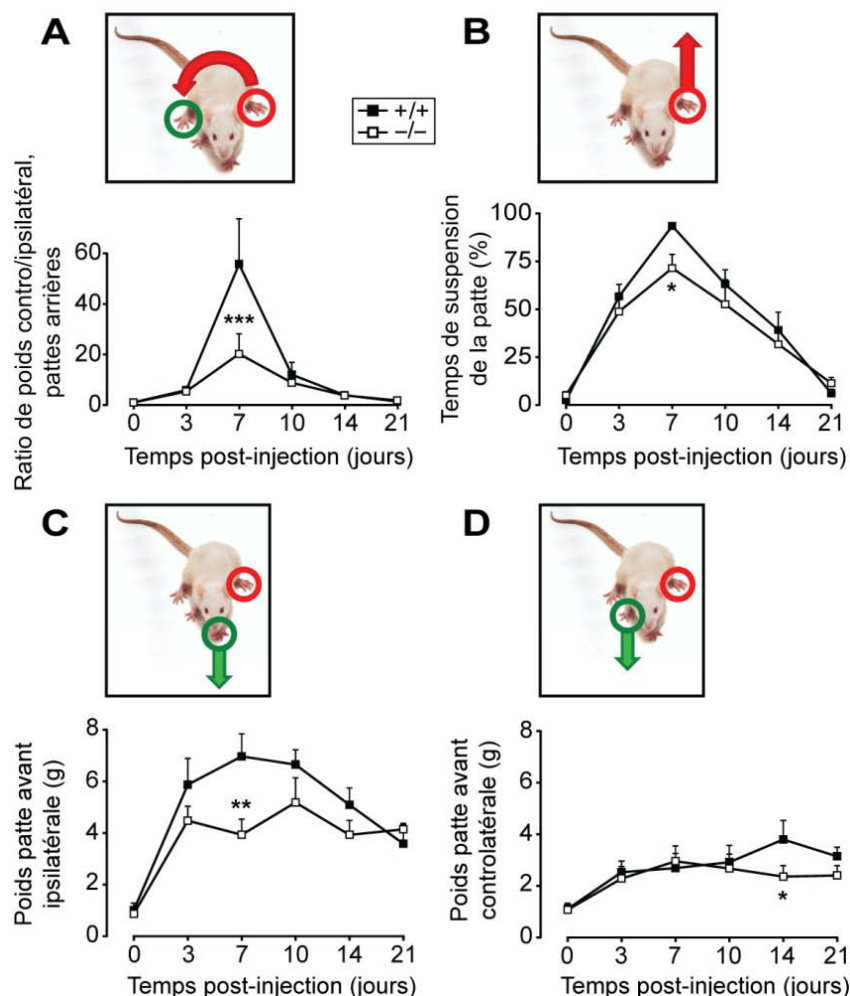


Figure 28. Impact du KO Nav1.9 sur la distribution pondérale d'animaux monoarthritiques.

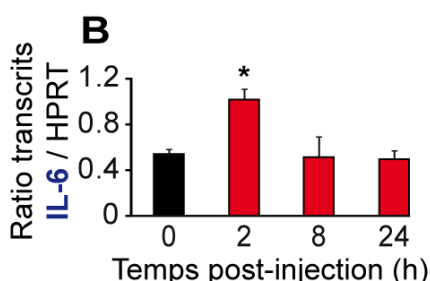
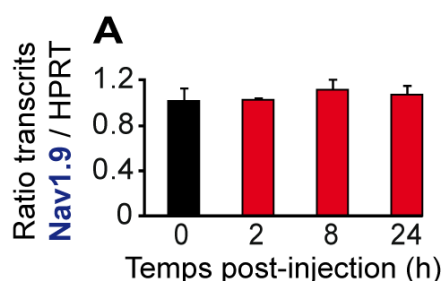
Des souris WT et KO Nav1.9 sont soumises au test du Dynamic Weight Bearing avant et 3, 7, 10, 14 et 21 jours après induction d'une monoarthrite. Les résultats présentés concernent le ratio de poids controlatéral/ipsilatéral des pattes arrières (A), le pourcentage de temps passé avec la patte enflammée en suspension (B), et le poids distribué sur les pattes avant ipsilatérale (C) et controlatérale (D). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ vs '+/+', two way ANOVA + Student-Newman-Keuls, n=5

les animaux à redistribuer leur poids vers l'avant, avec une augmentation du poids appliqué sur la patte avant ipsilatérale et, dans une moindre mesure, controlatérale (voir Figure 28A-B). Là encore, le déséquilibre observé est significativement réduit chez les souris KO Nav1.9 aux jours 7 (patte avant ipsilatérale) et 14 (patte avant controlatérale). Les résultats comportementaux obtenus sur le modèle monoarthrite impliquent donc également le canal Nav1.9 dans la douleur inflammatoire thermique et mécanique chronique, avec une implication plus marquée pendant les phases précoces de l'inflammation.

2. REGULATION DU CANAL NAV1.9 PAR L'INFLAMMATION

La transcription du gène *SCN11A*, codant la sous-unité Nav1.9, a tout d'abord été évaluée dans nos modèles d'inflammation subaiguë et chronique par qPCR au niveau des DRG ipsilatéraux L4 à L6, en suivant la cinétique observée pour les expériences de comportement. Aucune variation du transcrite Nav1.9 n'a pu être mise en évidence dans les modèles de carragénine plantaire (à 2, 8 et 24 h) ou de monoarthrite (à 3, 10 et 21 h, voir Figure 29A,C). Il a été montré que les niveaux d'IL-6 étaient augmentés dans les DRG lors d'une exposition des FAP à un environnement inflammatoire (Eliav et al., 2009; Rothman et al., 2009). Nous avons donc réalisé une quantification de l'ARNm IL-6 dans ces mêmes conditions. Dans les deux modèles nous observons une augmentation de la production d'ARNm IL-6 (bien que plus modérée dans le modèle carragénine), avec un maximum dans les phases précoces de ces modèles d'inflammation. Ceci est un contrôle positif pour la qPCR en elle-même, mais aussi par rapport à la zone d'innervation des DRG prélevés.

qPCR carragénine



qPCR monoarthrite

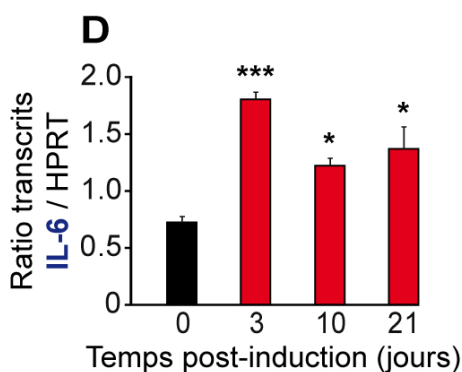
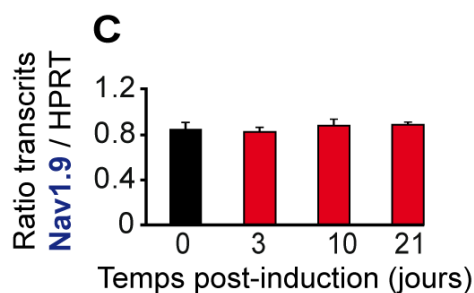


Figure 29. Impact de l'inflammation sur la transcription du canal Nav1.9 évaluée par qPCR.

2, 8 et 24 h après injection intraplantaire de carragénine 3% (A-B), ou 3, 10 et 21 jours après induction d'une monoarthrite (C-D) chez des souris, les DRG L4 à L6 ont été prélevés pour analyse de l'expression des transcrits Nav1.9 (A,C) et IL-6 (B,D) par qPCR. Un groupe de souris n'ayant reçu aucun traitement est également représenté en tant que jour 0. Les quantités de transcrite Nav1.9 et IL-6 sont normalisées par le gène de référence HPRT ("Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyltransferase"). *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 vs '0', one way ANOVA + Bonferroni vs '0', n=3

L'expression du canal Nav1.9 au niveau protéique est ensuite évaluée par immunohistochimie. 8 h après injection de carragénine, le marquage anti-Nav1.9 est diminué dans les DRG ipsilatéraux par rapport aux DRG contralatéraux (voir Figure 30A,B,E). A 24 h, on observe au contraire une forte augmentation de ce marquage dans les corps cellulaires ipsilatéraux (voir Figure 30C,D,F). La même observation est réalisée 16 h après injection de carragénine (données non présentées). La mesure du diamètre des neurones Nav1.9-positifs n'a pas mis en évidence de modification du pattern d'expression du canal au sein des DRG (voir Figure 30G-H). Dans le modèle de monoarthrite, nous n'avons pas mis en évidence de modification de l'expression protéique du canal Nav1.9 dans les DRG, 7 et 10 jours post-inflammation (données non présentées).

Immunohistochimie α -Nav1.9, modèle carragénine (DRG)

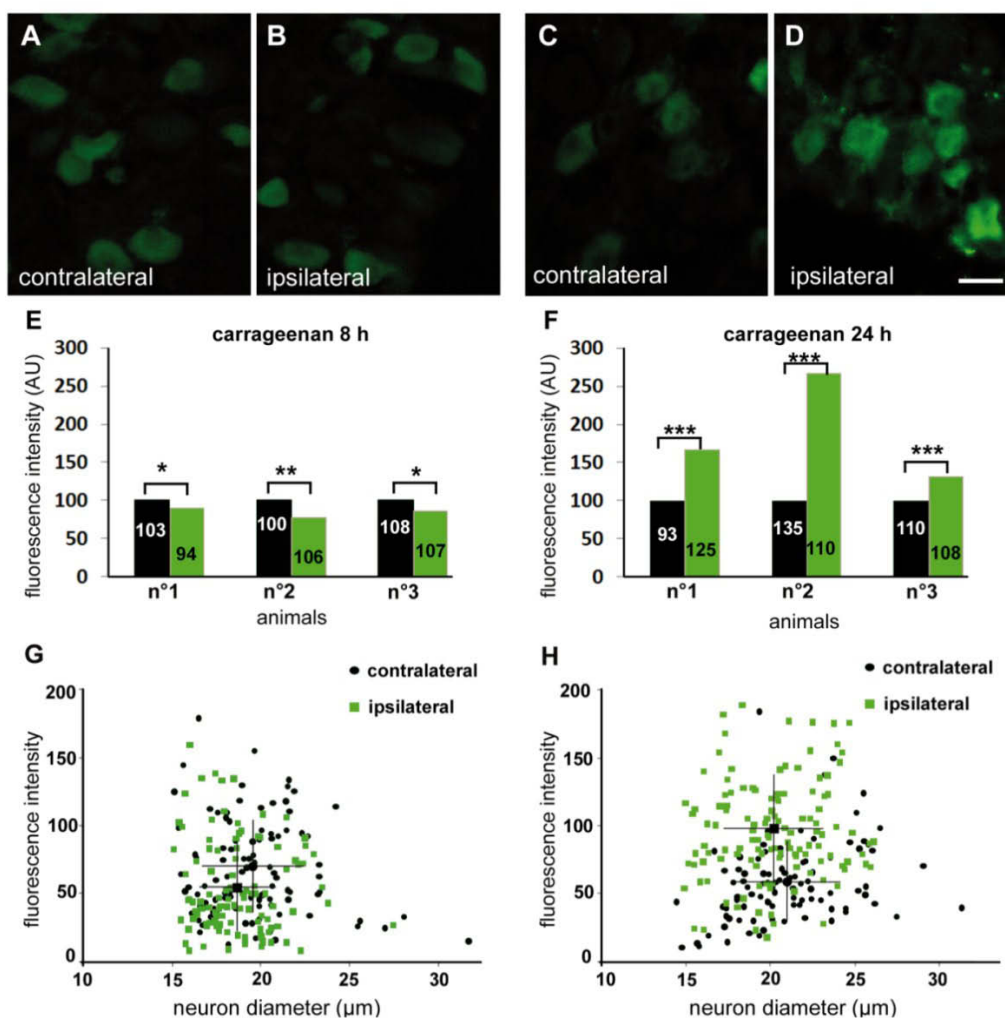


Figure 30. Effet de l'inflammation subaiguë sur l'expression protéique du canal Nav1.9.

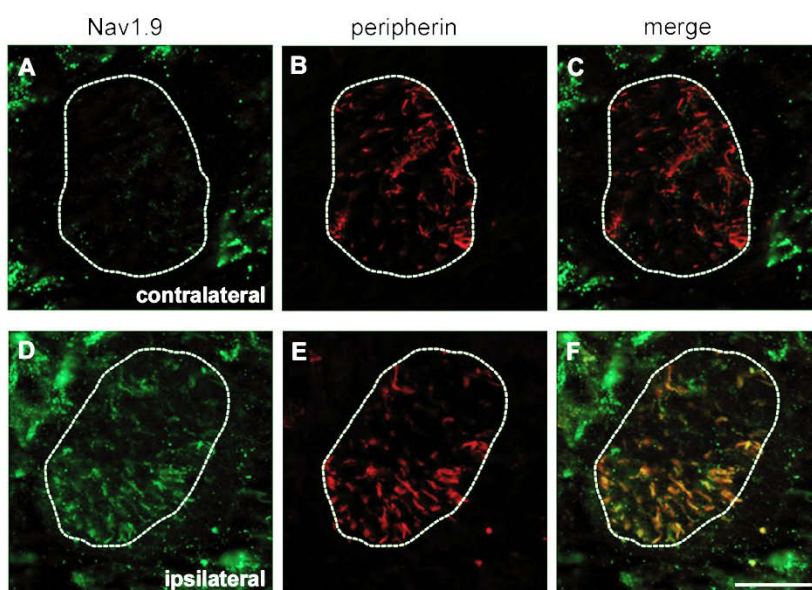
8 h (A,B,E,G) et 24 h (C,D,F,H) après injection intraplantaire de carragénine 3% chez des souris, les DRG contralatéraux (A,C) et ipsilatéraux (B,D) sont prélevés pour immunohistochimie anti-Nav1.9. La fluorescence moyenne mesurée chez 3 animaux différents est présentée en E et F. Les moyennes sont normalisées en fixant les valeurs contralatérales à 100 UA. Le nombre de neurones quantifiés est indiqué dans chaque barre de donnée. En G et H sont représentées les intensités de fluorescence individuelles des neurones en fonction de leurs diamètres. Les grands ronds et carrés noirs situent la moyenne des populations neuronales contralatérales et ipsilatérales, respectivement. Echelle = 20 μ m. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ vs 'contralateral', Mann & Whitney rank sum test. Figure issue de Lolignier et al., 2011. Expérimentation réalisée avec l'aide de Françoise Padilla, UMR CNRS 6231.

Contribution du canal Nav1.9 à la douleur inflammatoire

Résultats

Pour voir si ces modifications de l'expression de la sous-unité Nav1.9 au niveau des corps cellulaires sont corrélées à une modification du transport axonal, nous avons également réalisé un marquage anti-Nav1.9 au niveau des troncs nerveux cutanés innervant la patte enflammée. 24 h après injection, nous observons une augmentation qualitative du marquage Nav1.9 dans les fibres positives pour le marqueur périphérine, spécifique des fibres C (voir Figure 31). Ces données suggèrent que la modulation de l'expression des canaux Nav1.9 au niveau somatal sous-tend une augmentation de leur transport vers les terminaisons libres cutanées.

Immunohistochimie α -Nav1.9, modèle carragénine (troncs nerveux cutanés)

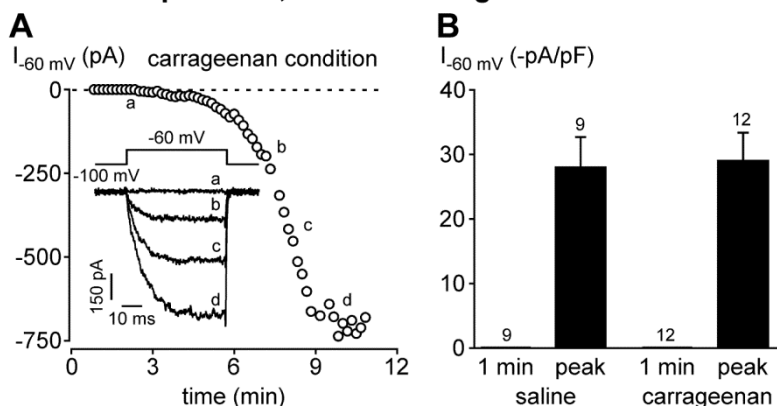


La dernière étape de ce travail a consisté à évaluer si l'inflammation résulte en une modification des propriétés électrophysiologiques du canal Nav1.9 dans les DRG, ou si la surexpression observée 24 h après injection de carragénine a un impact sur le courant Nav1.9 global (*i.e.* si ces canaux sont fonctionnels). Pour cela, nous avons réalisé des enregistrements de patch clamp en cellule entière sur les neurones de DRG prélevés puis mis en culture 24 h après injection de carragénine ou 7 jours après induction de la monoarthrite. Seuls les neurones de petite taille (respectivement 24 ± 2 et 23 ± 2 pF) innervant la zone enflammée ont été enregistrés grâce à une injection de marqueur rétrograde (Dil) permettant leur identification. Du fluorure a été ajouté à la solution contenue dans la pipette de patch pour moduler positivement le canal et permettre la visualisation de son courant au fur et à mesure que ce dernier diffuse à l'intérieur de la cellule.

Sur le modèle d'inflammation à la carragénine, suite à une dépolarisation à -60 mV, et 1 min après la rupture du patch, aucun courant Nav1.9 n'est détectable dans les cellules issues d'animaux enflammés ou témoins (ayant reçu le véhicule de la carragénine). Lorsque le pic d'activité du fluorure

est atteint (témoin : $8,9 \pm 1,0$ min ; carragénine : $9,8 \pm 1,2$ min ; n.s.), l'intensité du courant Nav1.9 enregistré est la même entre la condition témoin et enflammée (témoin : $-28,1 \pm 4,8$ pA/pF ; carragénine : $-29,2 \pm 4,3$ pA/pF ; n.s.), tout comme le seuil d'activation de Nav1.9 (témoin : $-71,7 \pm 1,5$ mV ; carragénine : $-74,2 \pm 0,8$ mV ; n.s.). Ce résultat suggère que les canaux néosynthétisés, observés dans les corps cellulaires 24 h après injection de carragénine, sont non fonctionnels.

Patch clamp Nav1.9, modèle carragénine



Patch clamp Nav1.9, modèle monoarthrite

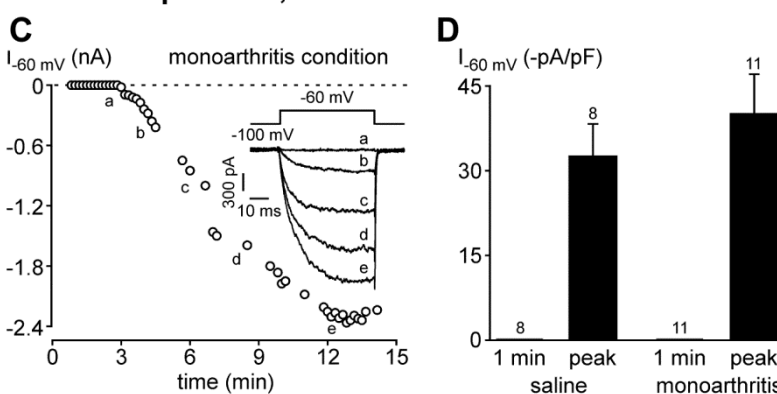


Figure 32. Propriétés électrophysiologiques du canal Nav1.9 dans les neurones de DRG d'animaux enflammés.

24 h après injection intraplantaire de carragénine 3% (A-B) et 7 jours après induction d'une monoarthrite (C-D), ou injection de sérum physiologique dans les deux cas, les DRG innervant la patte enflammée sont prélevés et les neurones mis en culture pour le patch clamp. (A,C) Cinétique d'augmentation de l'intensité du courant Nav1.9 par le fluorure. Le courant Nav1.9 est évoqué dans un neurone de 25 pF par des dépolarisations de 50 ms allant de -100 mV (potentiel de maintiens) à -60 mV, toutes les 10 s. 4 traces de courant représentatives, enregistrées au long de la cinétique comme indiqué, sont représentées. (B,D) Courant Nav1.9 moyen induit par une dépolarisation de -60 mV, 1 min après rupture du patch et au pic d'effet du fluorure. Le nombre de neurones enregistrés est indiqué au-dessus de chaque barre de donnée. Figure issue de Lolignier et al., 2011. Expérimentations réalisées avec l'aide de François Maingret, UMR CNRS 6231.

Un constat similaire est réalisé sur les neurones prélevés 7 jours après induction d'une monoarthrite. Aucun courant n'est détectable à -60 mV et 1 min après la rupture du patch, en condition témoin comme monoarthritique. Au maximum de l'effet fluorure (témoin : $12,2 \pm 0,7$ min ; monoarthrite : $11,6 \pm 0,8$ min ; n.s.), le courant induit par une dépolarisation à -60 mV (témoin : $-32,5 \pm 5,7$ pA/pF ; monoarthrite : $-40,1 \pm 6,9$ pA/pF ; n.s.) ou le seuil d'activation du canal (témoin : $-73,7 \pm 0,8$ mV ; monoarthrite : $-75,4 \pm 0,8$ mV ; n.s.) ne sont pas significativement différents.

IV. DISCUSSION & PERSPECTIVES

Dans cette première partie de la thèse, nous montrons tout d'abord l'implication du canal Nav1.9 dans la douleur inflammatoire aiguë à chronique sur le plan comportemental. Si le canal n'est pas impliqué dans la douleur provoquée par une stimulation thermique chaude ou mécanique, il contribue à la douleur spontanée induite par une inflammation aiguë, ainsi qu'à l'hypersensibilité douloureuse thermique et mécanique induite par une inflammation subaiguë à chronique. Dans le modèle d'inflammation subaiguë, nos observations sont corrélées à une modulation de l'expression protéique, mais non transcriptionnelle, du canal Nav1.9 dans les corps cellulaires des neurones des DRG (diminution puis forte augmentation), ainsi qu'à une augmentation de la quantité de canaux au niveau des terminaisons cutanées. Ceci n'est en revanche pas corrélé avec une variation des propriétés électrophysiologiques et du courant Nav1.9 dans les corps cellulaires. Au vu de ces résultats, nous proposons qu'en réponse à une inflammation, une augmentation post-transcriptionnelle de l'expression de canaux Nav1.9 a lieu dans les DRG simultanément à une augmentation du transport de ces canaux vers la périphérie. Les canaux néosynthétisés seraient donc vésiculaires et non fonctionnels au niveau des corps cellulaires, et destinés à augmenter l'excitabilité des terminaisons nerveuses, expliquant ainsi nos observations comportementales.

1. IMPLICATION DU CANAL NAV1.9 DANS LA DOULEUR INFLAMMATOIRE

Le premier constat que nous avons réalisé est la non-participation du canal Nav1.9 à la définition des seuils de douleur chez la souris ou le rat sain, constat effectué par la majorité des études précédentes. Concernant la sensibilité douloureuse en conditions inflammatoires, des travaux contradictoires ont montré soit la contribution (Priest et al., 2005; Amaya et al., 2006), soit l'absence de contribution (Leo et al., 2010; Yu et al., 2011) du canal Nav1.9 dans l'hypersensibilité thermique au chaud. Nous avons observé une forte implication du canal Nav1.9 dans ce phénomène d'hypersensibilité au chaud induit par une inflammation subaiguë. Chez un modèle d'inflammation chronique, le rôle joué par le canal Nav1.9 est significatif pendant la phase précoce de l'inflammation (jusqu'à 7-10 jours), d'autres acteurs de l'hypersensibilité semblant jouer un rôle plus important lors

Contribution du canal Nav1.9 à la douleur inflammatoire

Discussion & Perspectives

de la phase tardive. Au regard de ces informations, le canal Nav1.9 serait donc plus impliqué dans le développement que dans le maintien de l'hypersensibilité douloureuse inflammatoire.

Nous montrons également pour la première fois que le canal Nav1.9 participe à l'hypersensibilité mécanique, selon une cinétique reproduisant son implication dans l'hypersensibilité thermique au chaud. Si des travaux précédents montrent une moindre hypersensibilité mécanique chez des souris KO Nav1.9 en réponse à l'injection intraplantaire de médiateurs pro-inflammatoire (PGE₂, bradykinine ou IL-1 β ; Amaya et al., 2006) ou en réponse à une inflammation colique (test de distension colorectale, Martinez & Melgar, 2008), la contribution du canal Nav1.9 n'a pas été retrouvée dans les travaux réalisés à l'aide de modèles d'inflammation non-viscérale. Ces études ont cependant toutes été réalisées sur le même modèle d'inflammation, induite par injection intraplantaire de CFA, et avec le même test de von Frey (Priest et al., 2005; Amaya et al., 2006; Leo et al., 2010; Yu et al., 2011). La cinétique réalisée dans notre étude, la multiplicité des tests (von Frey, Dynamic Weight Bearing) et des modèles utilisés (subaiguë et chronique), ainsi que la validation effectuée par knock-down chez le rat nous permettent d'être confiants dans ce résultat. Des observations divergentes entre les modèles d'inflammation plantaire ont déjà été rapportées, y compris entre les modèles d'inflammation à la carragénine et au CFA, considérant par exemple l'effet du blocage des canaux P2X₃/P2K_{2/3} (McGaraughy et al., 2003), ou d'une délétion du gène *ASIC3* (Yen et al., 2009), sur l'hypersensibilité douloureuse inflammatoire. Le choix du modèle semble donc être un critère important, et ceci renforce l'intérêt de ne pas restreindre une étude à un seul et unique modèle animal.

Nous avons enfin montré que l'inactivation du gène codant la sous-unité Nav1.9 permettait de réduire la douleur mécanique provoquée comme spontanée, avec un effet positif sur le déséquilibre pondéral entraîné par une inflammation plantaire ou articulaire. L'évaluation de ce symptôme paraît plus pertinente par rapport à la clinique, les douleurs articulaires étant le symptôme le plus caractéristique chez les patients souffrant d'arthrite, avec un fort impact sur la qualité de vie.

2. REGULATION DU CANAL NAV1.9 PAR L'INFLAMMATION

Au cours de la deuxième partie de ce travail, nous avons réalisé une étude cinétique de l'expression et de la fonctionnalité du canal Nav1.9 dans les modèles d'inflammation subaiguë et chronique utilisés en comportement, ceci afin de permettre une corrélation avec les données comportementales. De nombreuses études ont montré l'augmentation, la diminution, ou encore la stabilité de l'expression du canal Nav1.9 en conditions inflammatoires (voir Tableau 4 p. 69 pour

rappel). Ces divergences sont un obstacle à la compréhension des mécanismes impliquant le canal Nav1.9 dans l'hypersensibilité douloureuse inflammatoire.

Dans nos conditions expérimentales, 8 h après injection de carragénine dans la patte de souris, nous observons une diminution transitoire du marquage Nav1.9 dans les corps cellulaires des neurones des DRG. Cette diminution est suivie à 16-24 h par une forte augmentation des niveaux de protéine dans le soma des neurones. Ces variations sont de plus corrélées avec une augmentation du marquage Nav1.9 dans les troncs nerveux cutanés, 24 h post-induction. Ces données suggèrent que l'état inflammatoire induit une augmentation du transport de canaux Nav1.9 vers les terminaisons nerveuses, entraînant une déplétion du pool somatal de canaux. Dans un deuxième temps, une augmentation de la production de canaux se mettrait en place pour reconstituer ce pool et soutenir l'accroissement du transport axonal. Aucune variation de l'expression protéique de Nav1.9 n'a été mise en évidence 7 et 10 jours après induction d'une monoarthrite, suggérant que ce mécanisme est spécifique de l'inflammation subaiguë ou qu'un équilibre entre l'export et la néosynthèse de canaux est atteint lors d'une inflammation chronique.

Le courant Nav1.9 enregistré dans les neurones innervant la zone enflammée 24 h après injection intraplantaire de carragénine, un temps pour lequel nous avons montré une forte augmentation de la quantité de canaux Nav1.9 dans les corps cellulaires, n'est pas modifié. Nous ne pouvons pas exclure que cette observation soit biaisée par la mise en culture des neurones, en présence notamment de NGF et de GDNF. Cependant le temps de culture est relativement court (3 à 6 h) et seul le GDNF a montré un effet sur Nav1.9, impliquant une surexpression détectable au bout de 7 jours de culture (Fjell et al., 1999). Une autre explication possible est que les canaux néosynthétisés sont non fonctionnels, constituant un pool vésiculaire destiné à soutenir le transport axonal observé. Un des moyens de valider cette hypothèse serait de provoquer l'exocytose de ces vésicules de stockage dans les neurones mis en culture 24 h après injection intraplantaire de carragénine. Différentes toxines (taipoxine, α -latrotoxine, β -bungarotoxine...) permettent de déclencher la fusion des vésicules avec la membrane cytoplasmique (Fathi H et al., 2001; Tedesco et al., 2009). Une stimulation électrique de 10 Hz pendant 5 min est également efficace pour provoquer l'exocytose de larges vésicules à noyaux denses, au sein desquelles ont été identifiés un grand nombre de protéines membranaires dont plusieurs sous-types de canaux ioniques (Zhao et al., 2011). Ces méthodes ont pour point commun d'induire un influx d'ions Ca^{2+} responsable de l'activation de la PLA_2 ou encore de la PKC. Ceci pourrait représenter un biais via une action directe sur les canaux déjà présents à la membrane. L'effet de l'insertion de nouveaux canaux à la membrane devra donc être distingué de

Contribution du canal Nav1.9 à la douleur inflammatoire

Discussion & Perspectives

l'effet direct d'un influx de Ca^{2+} par l'utilisation de toxine botulique ou tétanique¹⁸. Ces toxines sont classiquement utilisées pour bloquer l'exocytose de vésicules de neurotransmetteurs, mais un blocage de l'insertion de nouveaux canaux ioniques à la membrane a aussi été montré (Saxena et al., 2006; Tatsukawa et al., 2006; Schmidt et al., 2009). L'utilisation d'une telle toxine permettrait d'obtenir en patch clamp des enregistrements du courant Nav1.9 dans 3 conditions différentes (voir Figure 33) : neurones non stimulés (pas d'effet Ca^{2+} direct, ni d'exocytose), neurones stimulés (effet Ca^{2+} direct + exocytose) et neurones stimulés + toxine (effet Ca^{2+} direct seul) ; ce qui permettrait de déduire la part que représente l'exocytose de canaux dans l'augmentation de courant potentiellement observable. La présence de canaux Nav1.9 dans ces vésicules d'exocytose devrait également être observée de manière plus directe, par microscopie électronique ou par western blot sur des extraits vésiculaires (isolés par centrifugation différentielle). L'existence d'anticorps de qualité dirigés contre Nav1.9 reste un obstacle à cela. Seul l'anticorps généré à l'UMR CNRS 6231 a permis d'obtenir un résultat satisfaisant en immunohistochimie, et aucun anticorps n'a permis l'observation d'un marquage spécifique et reproductible en western blot, malgré de nombreuses conditions expérimentales testées.

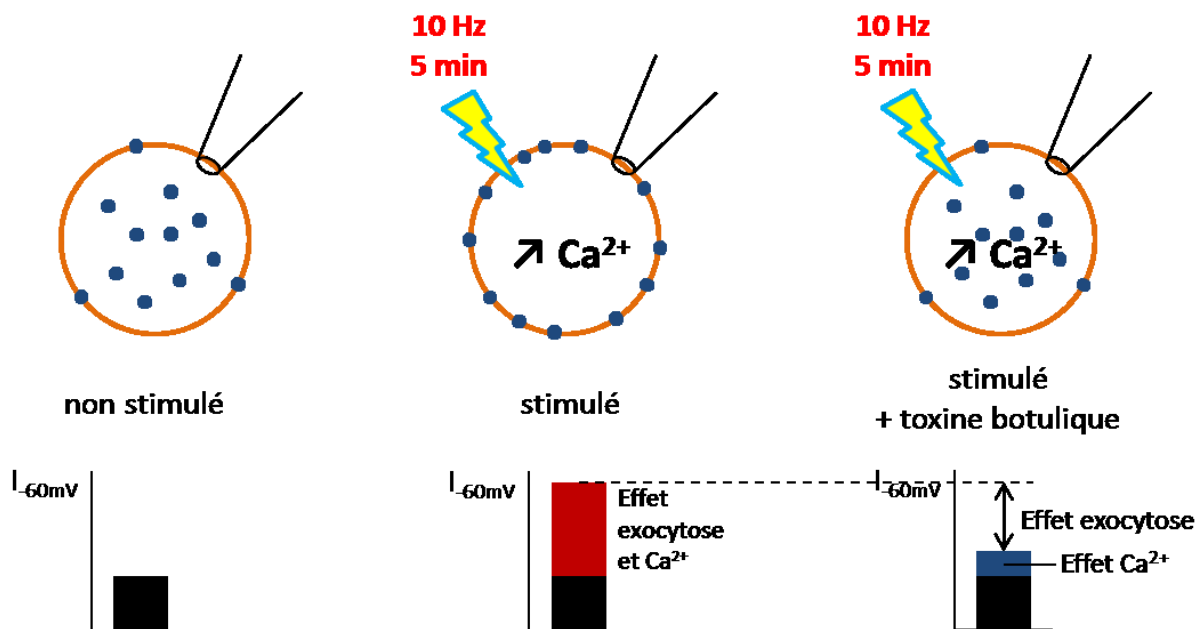


Figure 33. Expérience proposée pour l'évaluation du pool vésiculaire de canaux Nav1.9 dans des neurones en culture.

Le courant enregistré en patch clamp dans chaque condition est arbitrairement représenté par les histogrammes. Les points bleus représentent les canaux Nav1.9 vésiculaires ou à la membrane (cercle orange).

¹⁸ Inhibiteurs de la fusion vésiculaire par clivage de la Protéine Membranaire Associée aux Vésicules VAMP-2, indispensable à la formation du complexe d'attachement à la membrane cytoplasmique.

Nos résultats nous permettent de proposer un modèle de régulation du canal Nav1.9 en deux temps (voir Figure 34, premier temps n°2 et deuxième temps n°3, 4 et 5). Tout d'abord, une modulation très rapide des canaux Nav1.9 doit exister à la périphérie. En effet, suite à une injection intraplantaire de formol nous observons l'implication du canal Nav1.9 dans la douleur inflammatoire aiguë dès 10-15 min. Fumimasa Amaya et al. (2006) montrent quant à eux que le canal Nav1.9 est impliqué dans l'hypersensibilité induite par la PGE₂ intraplantaire dès 15 min. Deux arguments appuient cette idée de modulation rapide : le fait que des canaux Nav1.9 soient présents au niveau des terminaisons libres nociceptives en conditions physiologiques (Padilla et al., 2007; Persson et al., 2010), et les études électrophysiologiques montrant une augmentation du courant Nav1.9 suite à l'activation de voies de signalisation en aval des RCPG, possiblement via un mécanisme nécessitant l'activation de la PKC (Baker et al., 2003; Rush et Waxman, 2004; Baker, 2005; Maingret et al., 2008; Ostman et al., 2008). Nous avons réalisé des injections intraplantaires d'activateurs directs de la PKA (8-Br-AMPC, Pinto et al., 2008) ou de la PKC (Phorbol-12,myristate-13,acétate, Bölskei et al., 2005) chez des souris WT et KO Nav1.9 dans le but de valider ce mécanisme, mais aucune différence en terme de douleur spontanée n'a pu être observée entre les deux génotypes. Ceci pourrait être dû au fait qu'une modulation positive du canal Nav1.9 requiert l'activation concomitante de plusieurs voies de signalisation différentes, comme observé *in vitro* (Maingret et al., 2008). L'activation simultanée des deux voies pourra être réalisée en perspective de ce travail pour valider cette hypothèse.

Suite à ce phénomène rapide, un deuxième type de régulation serait mis en place, impliquant une augmentation de l'export de canaux Nav1.9 vers la périphérie soutenue par une surexpression de ces derniers. Ceci aurait pour conséquence l'augmentation de l'excitabilité des terminaisons nerveuses via l'augmentation du nombre de canaux présents à la membrane (et donc du courant global produit) en plus d'une modulation positive des canaux par les médiateurs de l'inflammation, comme montré par le travail de François Maingret et al. (2008).

Enfin, la surexpression protéique de Nav1.9 mise en évidence dans les DRG n'est pas corrélée avec une surexpression de son transcrite, ce qui montrerait que le canal Nav1.9 serait soumis à une régulation post-transcriptionnelle en contexte inflammatoire. Ce type de mécanisme a déjà été montré pour d'autres canaux, à commencer par le canal Nav1.8 dont la protéine seule se trouve augmentée suite à une inflammation du colon (King et al., 2009). Après induction d'une inflammation plantaire par injection de CFA, le canal TRPV1 est également exporté de manière unilatérale en direction des terminaisons libres, et ce mécanisme est soutenu par une surexpression de type post-transcriptionnelle du canal au niveau des corps cellulaires (Ji et al., 2002). Ce type de régulation peut être dû à une augmentation de la stabilité de l'ARNm, comme montré avec le canal Nav1.7 (Wada et

Contribution du canal Nav1.9 à la douleur inflammatoire

Discussion & Perspectives

al., 2004), ou à une augmentation de la traduction médiée par différentes protéines liant l'ARN, comme montré avec les canaux ENaC (Epithelial Na Channels, Perlewitz et al., 2010).

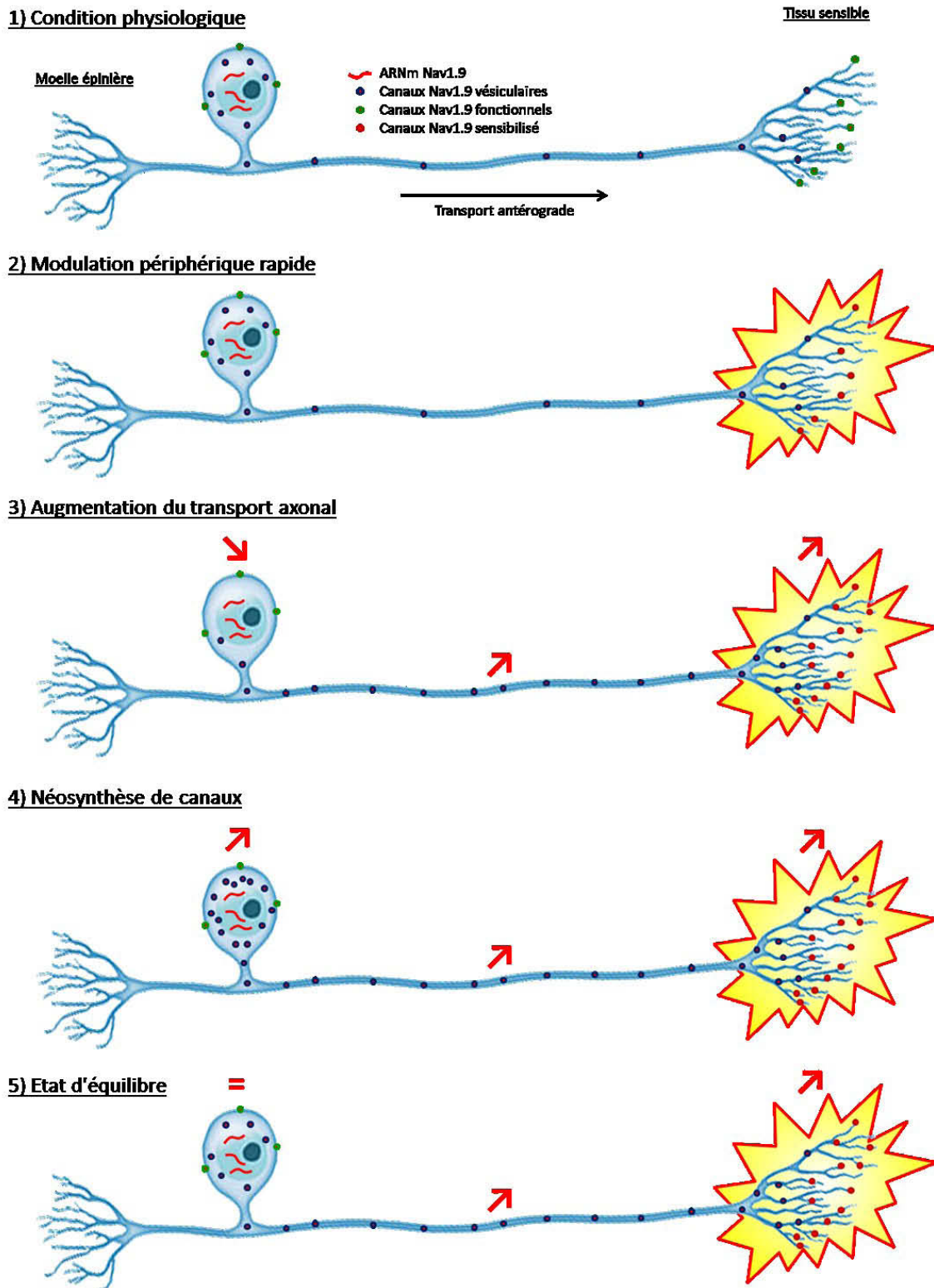


Figure 34. Modèle de régulation des canaux Nav1.9 par l'inflammation.

L'explosion jaune représente le milieu inflammatoire. Les signes rouges indiquent l'évolution de la quantité de canaux Nav1.9 par rapport à la condition physiologique.

3. PERSPECTIVES

Dans des travaux en cours de publication (Gaudio-Tyzra et al.), l'équipe de Patrick Delmas a montré qu'une toxine chimérique issue de la fusion entre une neurotoxine de scorpion et un antifongique de drosophile, la drosotoxine, pouvait déplacer la dépendance au voltage du canal Nav1.9 vers des valeurs plus négatives, et ce de manière très spécifique. Cette toxine facilite en conséquence l'activation des canaux Nav1.9, mais également leurs propriétés d'inactivation rapide et lente, résultant en une importante diminution de la conductance globale au bout de 1 à 2 min. Injectée par voie systémique chez la souris, la drosotoxine n'induit pas de modification des seuils de douleur au chaud ou à la pression, ni d'effets secondaires locomoteurs. Elle permet en revanche de réduire l'hypersensibilité douloureuse thermique et mécanique induite par injection intraplantaire de carragénine, reproduisant nos observations chez les souris KO Nav1.9. La drosotoxine, dont l'efficacité a été montrée sur les canaux Nav1.9 de rat et de souris, pourrait devenir un outil pharmacologique très intéressant si son efficacité est avérée sur le canal humain. Le clonage de la sous-unité hNav1.9 en système hétérologue ne permet pas l'obtention d'un canal fonctionnel, mais l'équipe de Johan Ostman et al. (2008) a réussi à rétablir le courant Nav1.9 chez des souris Nav1.9^{-/-} transfectées avec la sous-unité humaine, montrant certainement l'importance des partenaires protéiques du canal pour son fonctionnement et/ou son adressage cellulaire. Si la drosotoxine est capable de moduler les propriétés d'activation et d'inactivation de l'isoforme humaine de Nav1.9 dans un tel système, une transition vers la clinique serait alors possible, avec des débouchés potentiels pour le traitement des douleurs inflammatoires chez l'Homme.

Nav1.9 Channel Contributes to Mechanical and Heat Pain Hypersensitivity Induced by Subacute and Chronic Inflammation

Stéphane Lolignier^{1,2}, Muriel Amsalem³, François Maingret³, Françoise Padilla³, Mélanie Gabriac³, Eric Chapuy^{1,2}, Alain Eschalier^{1,2,4}, Patrick Delmas³, Jérôme Busserolles^{1,2*}

1 Clermont Université, Laboratoire de Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur, Clermont-Ferrand, France, **2** Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 766, Clermont-Ferrand, France, **3** Université de la Méditerranée, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 6231, Centre de Recherche en Neurobiologie et Neurophysiologie de Marseille, Marseille, France, **4** Centre Hospitalier Universitaire de Clermont-Ferrand, Service de Pharmacologie, Clermont-Ferrand, France

Abstract

Inflammation is known to be responsible for the sensitization of peripheral sensory neurons, leading to spontaneous pain and invalidating pain hypersensitivity. Given its role in regulating neuronal excitability, the voltage-gated Nav1.9 channel is a potential target for the treatment of pathological pain, but its implication in inflammatory pain is yet not fully described. In the present study, we examined the role of the Nav1.9 channel in acute, subacute and chronic inflammatory pain using Nav1.9-null mice and Nav1.9 knock-down rats. In mice we found that, although the Nav1.9 channel does not contribute to basal pain thresholds, it plays an important role in heat pain hypersensitivity induced by subacute paw inflammation (intraplantar carrageenan) and chronic ankle inflammation (complete Freund's adjuvant-induced monoarthritis). We showed for the first time that Nav1.9 also contributes to mechanical hypersensitivity in both models, as assessed using von Frey and dynamic weight bearing tests. Consistently, antisense-based Nav1.9 gene silencing in rats reduced carrageenan-induced heat and mechanical pain hypersensitivity. While no changes in Nav1.9 mRNA levels were detected in dorsal root ganglia (DRGs) during subacute and chronic inflammation, a significant increase in Nav1.9 immunoreactivity was observed in ipsilateral DRGs 24 hours following carrageenan injection. This was correlated with an increase in Nav1.9 immunolabeling in nerve fibers surrounding the inflamed area. No change in Nav1.9 current density could be detected in the soma of retrolabeled DRG neurons innervating inflamed tissues, suggesting that newly produced channels may be non-functional at this level and rather contribute to the observed increase in axonal transport. Our results provide evidence that Nav1.9 plays a crucial role in the generation of heat and mechanical pain hypersensitivity, both in subacute and chronic inflammatory pain models, and bring new elements for the understanding of its regulation in those models.

Citation: Lolignier S, Amsalem M, Maingret F, Padilla F, Gabriac M, et al. (2011) Nav1.9 Channel Contributes to Mechanical and Heat Pain Hypersensitivity Induced by Subacute and Chronic Inflammation. *PLoS ONE* 6(8): e23083. doi:10.1371/journal.pone.0023083

Editor: Steven Barnes, Dalhousie University, Canada

Received: April 29, 2011; **Accepted:** July 5, 2011; **Published:** August 12, 2011

Copyright: © 2011 Lolignier et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche, Institut UPSA de la Douleur (Union de Pharmacologie Scientifique Appliquée), Institut pour la Recherche sur la Moelle Epinière, Fondation pour la Recherche Médicale, Fondation Schlumberger, Association pour la Recherche sur le Cancer, Institut National du Cancer and by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique and Université d'Auvergne. S. Lolignier and M. Amsalem were supported by Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie fellowships. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: jerome.busserolles@u-clermont1.fr

Introduction

Acute or chronic pathological tissue inflammation strongly impacts on pain perception by sensitizing peripheral sensory neurons, giving rise to local and incapacitating pain hypersensitivity. Inflammatory mediators are known to enhance nociceptive primary afferent fibers excitability, in part by modifying expression and/or function of ionic channels present in nerve endings [1]. Voltage-gated sodium channels (VGSCs) play a fundamental role in neuronal excitability as they are directly responsible for initiation and propagation of action potentials, and their implication in different chronic pain disorders, including inflammatory pain, is relatively well established [2]. Among the 10 VGSC isoforms, two tetrodotoxin-resistant (TTX-R) channels, Nav1.8 and Nav1.9, are almost exclusively expressed in nociceptors, consistently with a

specific involvement in nociceptive pathways [3,4,5,6]. Nav1.8 has been shown to generate a slowly-inactivating sodium current with a relatively depolarized activation threshold, underlying the depolarizing phase of action potential in C-type fibers [7,8,9]. Several knock-down and knock-out studies have clearly demonstrated its contribution to pain hypersensitivity in both neuropathic and inflammatory models [10,11,12,13,14]. More recently, a link between Nav1.9 channel and inflammatory pain hypersensitivity has also been established [15,16].

Nav1.9 channel shows atypical properties. Its voltage-dependent activation is shifted to hyperpolarized potentials compared to Nav1.8 and TTX-sensitive channels [17], and its activation and inactivation curves are widely overlapping around the resting potential, enabling it to produce a persistent sodium current component [18,19]. Moreover, its slow activation kinetics argues

against a contribution of Nav1.9 to the depolarizing phase of the action potential [18,9]. Therefore, it has been initially proposed that Nav1.9 channel could rather contribute to the setting of the excitability of nociceptive sensory neurons by modulating both resting potential and response to subthreshold stimuli [20]. More recently, it has been shown that inflammatory soup-triggered up-regulation of Nav1.9 current increased the excitability of DRG neurons by generating long-lasting plateau depolarization and burst firing [21]. Other studies performed using different inflammatory protagonists such as prostaglandin E2, protein kinase C or G-proteins, also highlighted the link between inflammatory pathways and Nav1.9-mediated increase in the excitability of nociceptors [22,23,24,25].

This is consistent with the first behavioral observations made on Nav1.9-null mice [15,16]. Knock-out mice did not show any modification of their normal pain thresholds while both heat and pressure hypersensitivities in response to intraplantar injections of inflammatory mediators (prostaglandin E2, bradykinin or interleukin-1 β) were reduced. However, results obtained with inflammatory models remain to be completed and clarified as strong discrepancies exist. Indeed, deletion of Nav1.9 was shown to either diminish [15,16] or have no effect [26] on thermal pain hypersensitivity produced by carrageenan or complete Freund adjuvant (CFA) injections, and the reduction of mechanical hypersensitivity observed in Nav1.9^{-/-} mice in response to inflammatory mediators was not confirmed in the CFA-induced paw inflammation model [15,16,26] that is the only one tested until now. Furthermore, whether Nav1.9 expression is modified during inflammation is also still unclear, as conflicting results have been published in different models, or at different time-points following inflammation, showing either increased [5,16,27] or stable [28,29] Nav1.9 expression.

As to settle those issues, we first performed a time-course study of Nav1.9 involvement in thermal and mechanical pain hypersensitivity, using both subacute and chronic (monoarthritis) inflammatory pain models in Nav1.9 knock-out mice. Mechanical pain was not only assessed by von Frey or paw pressure tests, but also using a newly developed weight bearing test in freely moving animals. To reinforce the robustness of the behavioral results obtained with Nav1.9 knock-out mice, we performed a knock-down study in inflamed rats. Behavioral data were then correlated with molecular and electrophysiological analysis of Nav1.9 regulation in the same inflammatory pain models to allow an overall comprehension of the role played by this channel in pain hypersensitivity along the time-course of inflammation.

We first confirmed that healthy Nav1.9-null mice have no modified heat and pressure pain thresholds. Then we showed that the channel is involved in both heat and mechanical pain hypersensitivity during subacute inflammation, and in the early phase of monoarthritis development. Similar observations were performed in the subacute inflammatory model using knock-down strategy in rats. Behavioral results were not correlated with changes in the channel transcription, but rather with variations of protein levels in DRG cell bodies and with an increase in Nav1.9 transport to the nerve endings surrounding the site of inflammation. No modulation of Nav1.9 current was detected in the soma of neurons innervating the inflamed zone, suggesting that the newly produced channels are non-functional at the cell body level.

Results

Reduction of acute inflammatory pain in Nav1.9^{-/-} mice

Formalin test was performed to assess acute inflammatory pain in this Nav1.9^{-/-} mouse strain (Fig. 1). Following intraplantar

formalin injection, mice painful behavior, characterized by the licking or biting of the injected paw, was monitored during the two typical phases of the test (0 to 5 min and 10 to 45 min). During the first and non-inflammatory phase, Nav1.9^{-/-} mice and wild-type (WT) littermates exhibited similar spontaneous pain-related behavior. In contrast, we observed a strong diminution in the paw licking time in Nav1.9 knock-out mice during the second and inflammatory phase of the test, which confirms the role played by Nav1.9 in acute inflammatory pain [15].

Involvement of Nav1.9 in heat and mechanical pain hypersensitivity induced by subacute inflammation

We evaluated the contribution of Nav1.9 channels to mechanical and heat pain hypersensitivity in the carrageenan subacute paw inflammation model. Mice were subjected to different thermal and mechanical pain tests over a 24 h period following intraplantar carrageenan. The intensity of the inflammatory reaction was evaluated in Nav1.9^{-/-} and WT mouse strains by measuring the induced edema. No difference in paw swelling was observed between strains (see supplementary Fig. S1A). Heat pain threshold was evaluated by paw withdrawal latency after immersion in a 46°C water bath (Fig. 2A). Basal responses to noxious heat were identical between the two mouse strains, but following intraplantar carrageenan WT mice developed a strong hypersensitive phenotype ($p \leq 0.003$ from 2 to 24 h) that was significantly reduced in Nav1.9^{-/-} mice at all times post-injection.

Similarly, carrageenan injection induced a subacute mechanical hypersensitivity in WT mice ($p \leq 0.003$ from 2 to 24 h) which was significantly reduced in Nav1.9^{-/-} mice 6 and 8 h post-injection (Fig. 2B). To confirm the lower hypersensitivity in Nav1.9 knock-out mice, we performed a dynamic evaluation of the weight bearing of animals on their 4 limbs over a 5 min period. Eight hours following carrageenan injection, a slight increase in contra/ipsilateral weight ratio (Fig. 2C), as well as a strong increase in inflamed hindpaw lifting time (Fig. 2D), were observed in WT mice ($p = 0.014$ and $p < 0.001$, respectively). The weight applied on the forepaws was not affected (Fig. 2E-F). In Nav1.9 knock-out mice, no such weight imbalance or postural alteration was detected ($p = 0.247$ for contra/ipsilateral weight ratio, $p = 0.883$ for paw lifting time) and a significant difference between the two strains was also found 8 h post-injection. Taken together, these data demonstrate the involvement of Nav1.9 in mechanical pain hypersensitivity in a subacute model of paw inflammation.

Compensatory mechanisms may occur in knock-out strains, leading to changes in the expression of non-targeted genes, as

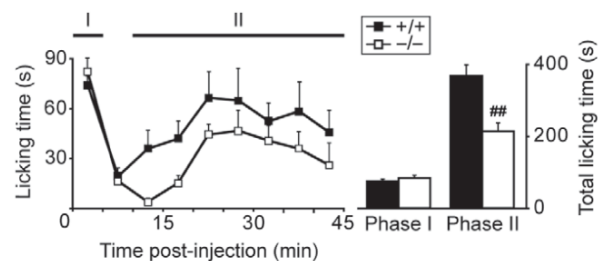


Figure 1. Nav1.9 knock-out mice behavioral response to intraplantar formalin injection. Following intraplantar formalin, the time spent licking/biting the injected paw is monitored during 45 min in Nav1.9^{+/+} (n=9) and Nav1.9^{-/-} (n=8) mice. Data were summed for the two typical phases of the test. Phase I: 0 to 5 min. Phase II: 10 to 45 min. ### $p < 0.01$ vs '+/+', Student's unpaired t-test. doi:10.1371/journal.pone.0023083.g001

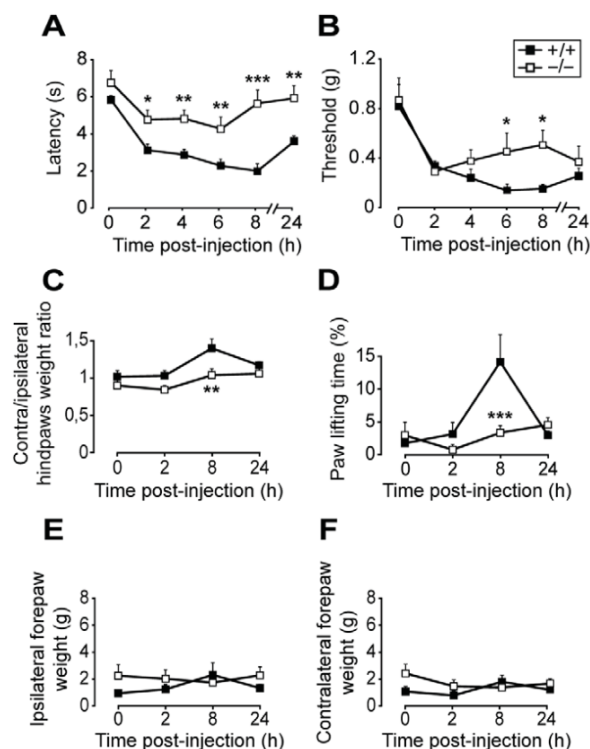


Figure 2. Nav1.9 knock-out mice pain sensitivity and weight imbalance following carrageenan intraplantar injection. Following intraplantar carrageenan, heat and mechanical pain sensitivity of Nav1.9^{+/+} and Nav1.9^{-/-} mice was assessed over 24 h using 46°C paw immersion test (A, n=9), von Frey test (B, n=9), and dynamic weight bearing test (C–F, n=5). The ipsi/contralateral hindpaw weight ratio is shown in C and the ipsilateral paw lifting time in D. The mean weights applied on ipsilateral and contralateral forepaws are also shown in E and F, respectively. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs '+/+', two way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls all pairwise multiple comparison test. doi:10.1371/journal.pone.0023083.g002

previously shown in Nav1.8^{-/-} mice in which an increase in TTX-sensitive current density has been observed [11]. To prevent any misinterpretation of the results obtained with Nav1.9^{-/-} mice, we assessed behavioral reactions to noxious stimuli in Nav1.9 knock-down rats following carrageenan paw inflammation. This consisted in intrathecal injections of antisense oligodeoxynucleotides (ODN) complementary to Nav1.9 transcript twice a day during 3 days. Nav1.9 down-regulation by antisense ODN, together with the lack of effect of a mismatch ODN or saline injection, were validated in L5 DRGs by immunohistochemistry (Fig. 3A–C). Following Nav1.9 antisense treatment, no difference was found in heat and mechanical pain thresholds (Fig. 3D–E). Paw inflammation was then induced by intraplantar carrageenan injection. This lowered heat and mechanical pain thresholds of rats, but the observed hypersensitivity was significantly reduced in the Nav1.9-antisense treated group for both tests. These data confirm the involvement of Nav1.9 channel in inflammatory pain hypersensitivity, whatever the sensory modality tested.

We then performed a time course study of Nav1.9 transcript and protein expression in L4 to L6 DRGs by quantitative RT-PCR and immunohistochemistry, respectively. No variation in Nav1.9 transcript level was found at any time post-carrageenan

(Fig. 4A). IL-6 transcript was assessed as a positive control, and a two fold increase was detected in ipsilateral DRGs 2 h following carrageenan injection (Fig. 4B). A slight decrease (around 15%) of Nav1.9 immunolabeling was observed 8 h after carrageenan injection in ipsilateral neurons compared to contralateral ones (Fig. 5A–B,E). Such a decrease is significant in every tested animal and was not observed in saline injected animals at the same time point (data not shown). 24 h after injection, Nav1.9 immunolabeling was increased in ipsilateral DRG neurons compared to contralateral ones (Fig. 5C–D,F). Increase in Nav1.9 immunolabeling was already detectable 16 h post-injection (data not shown). We then assessed the size of Nav1.9-positive neurons since some pathological processes have already been reported to induce Nav1.9 expression in larger DRG neurons [30]. The distribution of Nav1.9 labeling intensity plotted against the size of neurons did not show any difference at any time point tested between contra and ipsilateral DRG, as illustrated in Fig. 5G–H. To test whether the transient decrease in Nav1.9 protein level in DRG neuron somata resulted in an increase in Nav1.9 transport to peripheral nerve endings, we searched for an accumulation of Nav1.9 protein in inflamed territories. As it is nearly impossible to have an exhaustive quantification of Nav1.9 protein level in sensory endings within the epidermis, we rather looked at small nerve trunks in the vicinity of the epidermis. Such trunks correspond to very distal part of the sensory fibers and were identified by the peripherin marker (Fig. 6B,E). Twenty-four hours after carrageenan injection, a marked accumulation of Nav1.9 protein was observed in nerve trunks surrounding the inflamed skin (Fig. 6).

Finally, we investigated whether Nav1.9 current was potentiated in the carrageenan subacute inflammation model. To this aim, 24 h following intraplantar carrageenan injection we performed whole-cell patch clamp recordings from cultured small DRG neurons (24±2 pF, n=21) that were innervating the inflamed zone, as seen by retrograde labeling with the fluorescent dye DiI that was previously injected intraplantarly. Nav1.9 current is typically recorded at a test potential of -60 mV using fluoride in the pipette solution [18,19]. Under these experimental conditions, little if any Nav1.9 channel activity could be detectable immediately after achieving the whole cell configuration. The Nav1.9 current developed as fluoride diffuses into the cell. In carrageenan condition, no Nav1.9 current was detectable at -60 mV, 1 min after the rupture of the membrane. However, as fluoride diffuses, Nav1.9 currents could be recorded within minutes (time to peak: 9.8±1.2 min, n=12, Fig. 7A). This up-regulation of Nav1.9 by fluoride was thereafter compared to the control condition (*i.e.* saline injected-mice). As in the carrageenan condition, Nav1.9 current was first not detectable at -60 mV, 1 min after achieving the whole cell configuration, but was up-regulated by internal fluoride within minutes (time to peak: 8.9±1.0 min, n=9, Fig. 7B). Neither the current amplitude measured at -60 mV (-28.1±4.8 pA/pF, n=9 vs -29.2±4.3 pA/pF, n=12) nor the current activation threshold (-71.7±1.5 mV, n=9 vs -74.2±0.8 mV, n=12) were significantly different between saline and carrageenan conditions, respectively, suggesting that the observed increase in Nav1.9 expression in cell bodies 24 h following carrageenan injection involves non-functional channels.

Involvement of Nav1.9 in chronic inflammatory pain in monoarthritic mice

To assess whether Nav1.9 channel also contributes to chronic inflammatory pain, we performed a time-course study of Nav1.9^{-/-} and WT mice pain thresholds following monoarthritis induction by two peri-articular CFA injections on either side of the left ankle.

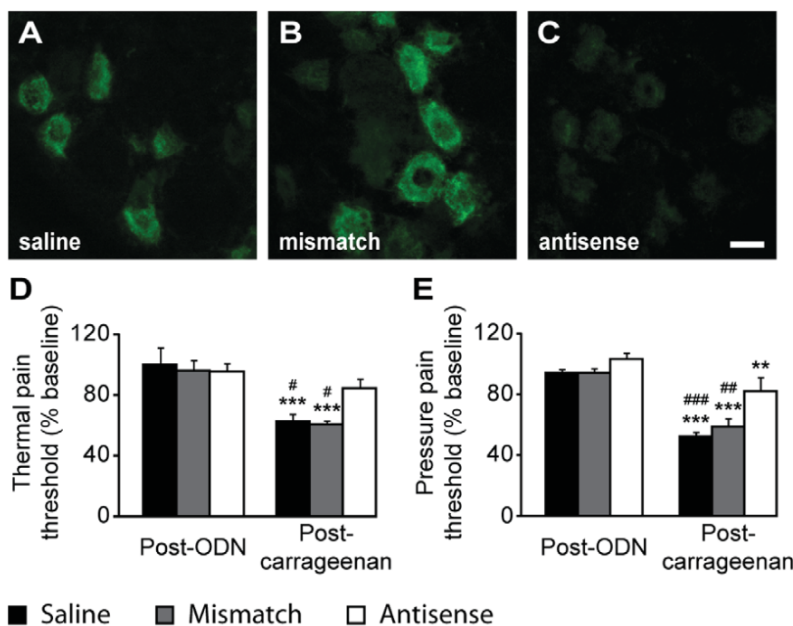


Figure 3. Rats pain sensitivity following Nav1.9 antisense treatment and intraplantar carrageenan injection. Nav1.9 immunolabeling on L5 DRGs from rats treated intrathecally with saline (A), mismatch ODN (B) and antisense ODN (C) for 3 days. Heat (D) and mechanical (E) pain thresholds of rats (n=8) are evaluated by 46°C paw immersion and paw pressure tests, respectively, before and 4 h after carrageenan intraplantar injection. Pain thresholds are given as percentage from pre-ODN baseline. **p<0.01, ***p<0.001 vs 'Post-ODN' ; #p<0.05, ###p<0.01, ####p<0.001 vs 'Antisense', two way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls all pairwise multiple comparison test. Scale bar 20 μm. doi:10.1371/journal.pone.0023083.g003

Ankle swelling did not differ between the two mouse strains (see supplementary Fig. S1B). As for the intraplantar carrageenan model, heat pain threshold was evaluated by paw immersion test in a 46°C water bath, up to the ankle. This model resulted in a strong hypersensitivity to heat, characterized by the reduction of paw withdrawal latencies from day 3 to day 21 in WT animals (p≤0.007, Fig. 8A). A significant reduction in heat hypersensitivity was observed in Nav1.9^{-/-} mice compared to the WT strain from day 3 to day 7, similarly to what we obtained in WT mice treated by daily intraperitoneal indomethacin injections (data not shown). Mechanical pain, traduced by ankle incapitance, was also evaluated using the dynamic weight bearing. In WT mice, we observed a strong increase in contra/ipsilateral weight ratio (p<0.001 at day 7 only, Fig. 8B) as well as in inflamed hindpaw lifting time (p<0.001 from day 3 to 14, non-significant at day 21,

Fig. 8C), with an acme 7 days following monoarthritis induction. Anteroposterior weight balance was also affected as a strong increase in ipsilateral (p≤0.007 from day 3 to 21, Fig. 8D) and to a less extent contralateral (p≤0.050 at days 3, 10, 14 and 21, Fig. 8E) forepaws weight could be detected, with a peak at day 7 and day 14, respectively. All these observations were also made on Nav1.9 knockout mice, but a significant reduction in the phenotype intensity was observed at day 7 for the ipsi/contralateral weight ratio, the inflamed paw lifting time and the ipsilateral forepaw weight, and at day 14 concerning the contralateral forepaw. Taken together, these data show that Nav1.9 channels contribute to heat as well as mechanical arthritic pain.

In this model, quantitative RT-PCR on L4 to L6 DRGs did not show any variation in Nav1.9 transcript level from day 0 to day 21 (Fig. 9A) whereas IL-6 transcript, used as a positive control, was significantly increased from day 3 to 21 (Fig. 9B). Seven and ten days following monoarthritis induction, no significant change in Nav1.9 immunolabeling was detected in ipsilateral DRG neurons compared to contralateral neurons (data not shown).

We finally investigated whether Nav1.9 channel activity was modulated in the monoarthritic chronic inflammation model. We performed the same experiments as with the carrageenan model, i.e. whole-cell patch clamp recordings from cultured small DRG neurons (23±2 pF, n=19) removed from animals 7 days following monoarthritis induction. Only cells stained by retrograde labeling with the fluorescent dye DiI (injected around the tibio-tarsal joint) were considered. In monoarthritis condition, no Nav1.9 current is detectable, at -60 mV, 1 min after the rupture of the membrane. After several minutes (time to peak: 11.6±0.8 min, n=11), Nav1.9 current was up-regulated by internal fluoride (Fig. 10A) with a mean current amplitude measured at -60 mV of -40.1±6.9 pA/pF (n=11) and a current activation threshold of

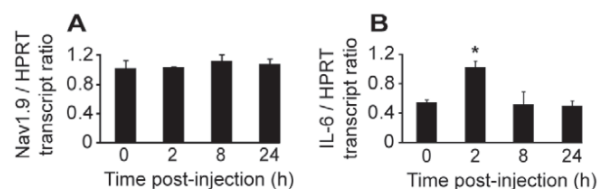


Figure 4. Nav1.9 and IL-6 mRNA expression in mouse lumbar DRGs following intraplantar carrageenan. Quantitative PCR performed on Nav1.9 (A) and IL-6 (B) transcripts in L4 to L6 ipsilateral DRGs of mice following intraplantar carrageenan (n=3). Results are given normalized to HPRT transcript levels. *p<0.05 vs '0', one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparisons versus control group. doi:10.1371/journal.pone.0023083.g004

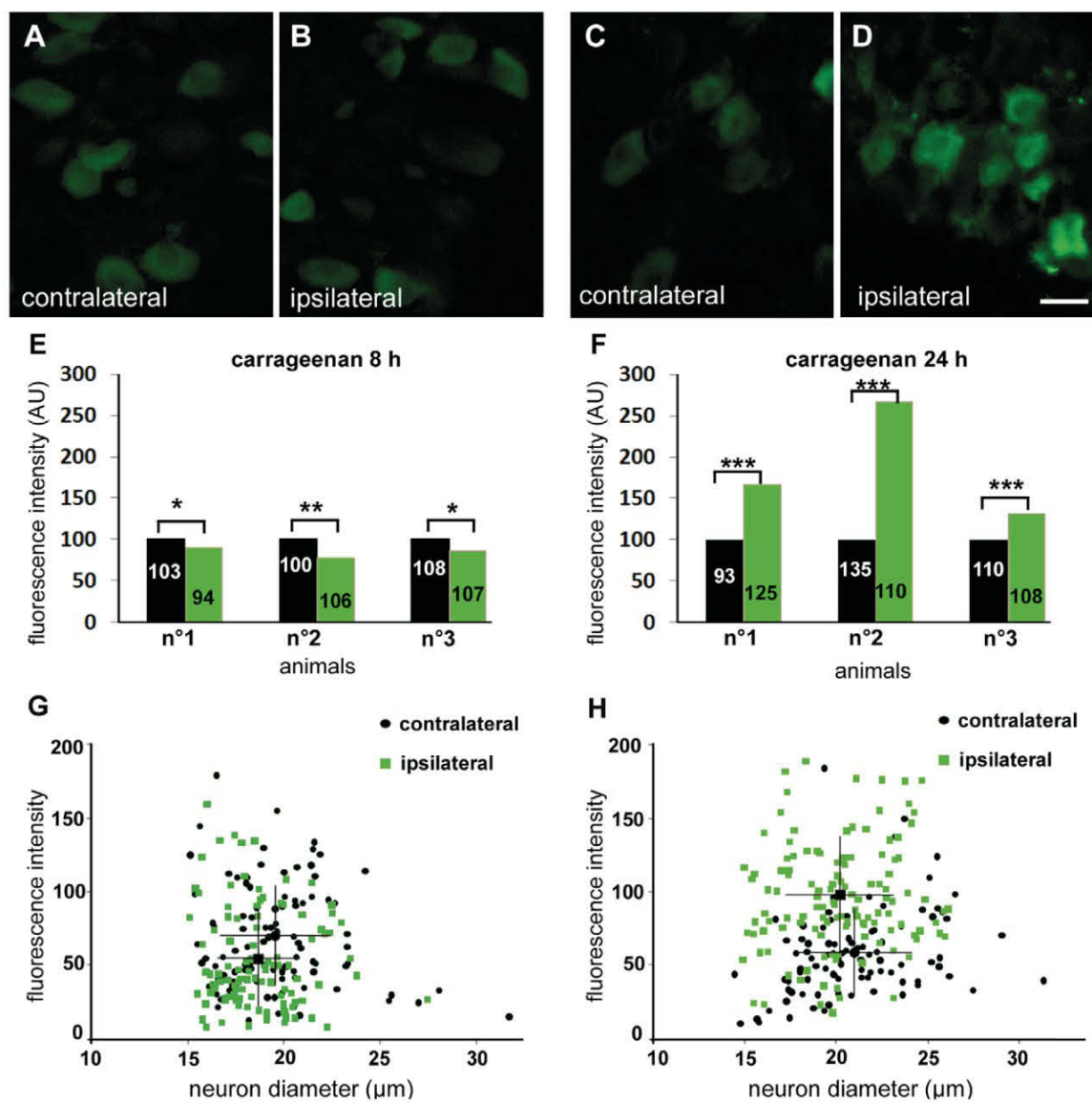


Figure 5. Modulation of Nav1.9 protein level in sensory neuron cell body during carrageenan induced inflammation. Nav1.9 immunolabeling of ipsilateral and contralateral DRG sections from animals, 8 h (A–B) and 24 h (C–D) following injection of 3% carrageenan. Mean fluorescence intensities of ipsilateral and contralateral neurons from 3 different animals are shown in E and F, 8 h and 24 h post-injection, respectively (exact numbers of neurons quantified is indicated in each bar). To better compare fluorescence intensities, mean grey values were normalized setting contralateral neuron populations to 100 AU. Mean grey value and diameter of Nav1.9-labeled neurons were measured in ipsilateral (green squares) and contralateral (black circles) DRGs and plotted into graphs (G–H). Large black square and circle in each graph represent the mean \pm SEM intensity/diameter coordinates of ipsilateral and contralateral neurons populations, respectively. Scale bar 20 μ m. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 vs ‘contralateral’, Mann and Whitney rank test. doi:10.1371/journal.pone.0023083.g005

-75.4 ± 0.8 mV ($n = 11$). In control condition, Nav1.9 current was also undetectable, at -60 mV, 1 min after achieving the whole cell configuration (Fig. 10B) and then reached a maximum amplitude at -60 mV of -32.5 ± 5.7 pA/pF ($n = 8$) within 12.2 ± 0.7 min ($n = 8$). Nav1.9 activation threshold was -73.7 ± 0.8 mV ($n = 8$) in control condition, which was undistinguishable from the activation threshold measured in the monoarthritis condition.

Discussion

In the present study, we investigated whether Nav1.9 channel contributes to acute, subacute and chronic inflammatory pain in mice and rats using knock-out and knock-down strategies, respectively. We showed that whereas Nav1.9 is not involved in basal pain thresholds, it plays an important role in acute inflammatory pain, as well as in both mechanical and heat pain

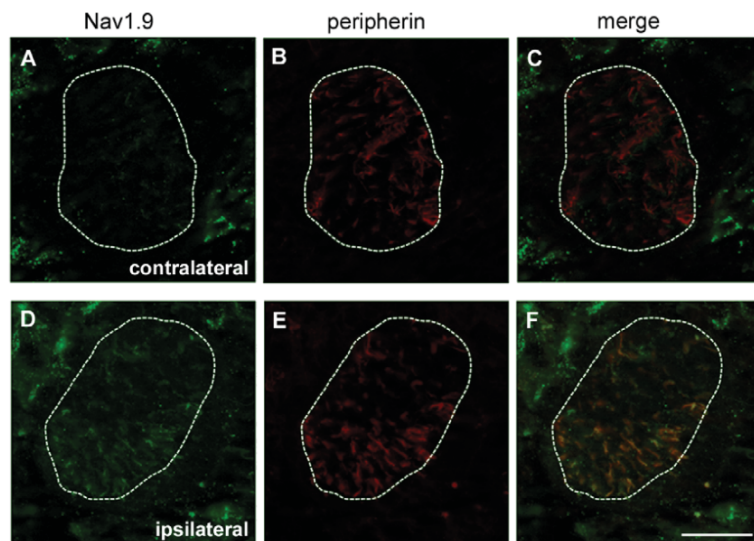


Figure 6. Modulation of Nav1.9 protein level in cutaneous sensory fibers innervating the carrageenan-inflamed paw. Co-labeling of Nav1.9 (A, D) and peripherin (B, E) in small cutaneous nerve trunks in contralateral (A–C) and ipsilateral (D–F) paw skin 24 h after intraplantar carrageenan injection. Merge images are shown in C and F. Scale bar 28 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0023083.g006

hypersensitivities produced by subacute paw and chronic joint inflammation. In the subacute inflammatory pain model, these behavioral observations were correlated with post-transcriptional modulations of Nav1.9 expression in DRG cell bodies, and with a strong upregulation of the protein in the peripheral nerve trunks. Furthermore, at a time where Nav1.9 was strongly overexpressed in DRG cell bodies, no Nav1.9 current increase could be detected, suggesting that the newly produced channels are non-functional and rather intended to be exported to nerve terminals.

The relationship between Nav1.9 and inflammatory pain has previously been pointed out by different studies, but this is the first time that one correlates behavioral, molecular and electrophysiological

data on the same inflammatory models, with time-course monitoring. These previous studies also brought out some discrepancies that needed to be clarified. Firstly, heat hypersensitivity induced by intraplantar carrageenan [15,26] or CFA [15,16,26] have been reported to be either reduced [15,16] or unaffected [26] in Nav1.9-null mice. Our results show that Nav1.9 is involved in the decrease in inflammatory heat pain threshold following carrageenan injection. In the chronic monoarthritis model, Nav1.9 invalidation also weakened heat hypersensitivity phenotype, but mostly during the first week of monitoring. Those results confirm the role of Nav1.9 channel in establishing inflammatory heat pain hypersensitivity, and to a lower extent, in its maintenance.

On the other hand, it has previously been shown that Nav1.9 was not involved in inflammatory mechanical hypersensitivity following intraplantar CFA [15,16,26]. However, this has never been assessed using a different inflammatory pain model, with the exception of colorectal distention following colonic TLR7 activation [31]. In this last study, Nav1.9 knock-out mice presented a reduction of visceral hypersensitivity to mechanical stimulation. Furthermore, a reduction of mechanical pain hypersensitivity induced by intraplantar injections of inflammatory mediators (prostaglandin E₂, bradykinin or interleukin-1 β) has been observed in Nav1.9^{-/-} mice [16]. The role played by Nav1.9 in mechanical hypersensitivity driven by inflammation is therefore far from clear and further exploration was needed. Following intraplantar carrageenan injection, our Nav1.9^{-/-} mice exhibited reduced mechanical hypersensitivity compared to WT littermates. This phenotype, observed with the von Frey test also used in the previously cited studies [15,16,26], was confirmed with the use of a new operator-independent dynamic weight bearing test. Moreover, our data are supported by the reduction of carrageenan-induced mechanical hypersensitivity observed in Nav1.9 knock-down rats. Finally, we observed a decrease in weight imbalance in monoarthritic knock-out mice, showing that Nav1.9 invalidation is also able to reduce chronic joint pain and the resultant posture impairment. The negative results previously

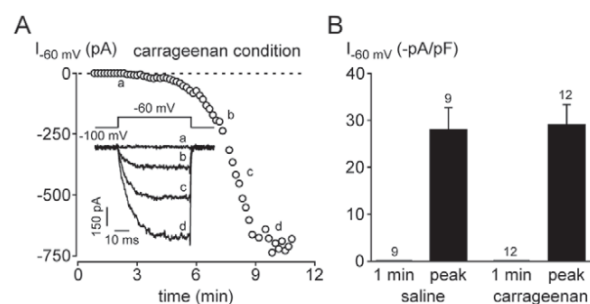


Figure 7. Nav1.9 current properties in the carrageenan-induced paw inflammation model. (A) Time-course of Nav1.9 current up-regulation induced by dialysis of fluoride in the carrageenan condition. Nav1.9 currents are evoked in a DRG neuron (25 pF) by 50 ms-depolarizing steps from -100 to -60 mV every 10 s. The inset shows representative Nav1.9 currents recorded during the time course of the experiment (as indicated). (B) Mean Nav1.9 current evoked at -60 mV 1 min after patch rupturing and at the peak of the up-regulation by internal fluoride. The experiments were performed in DRG neurons from mice injected either with saline (control condition, left panel) or carrageenan (inflammatory condition, right panel). The number of cells analyzed is shown on the top of each chart. doi:10.1371/journal.pone.0023083.g007

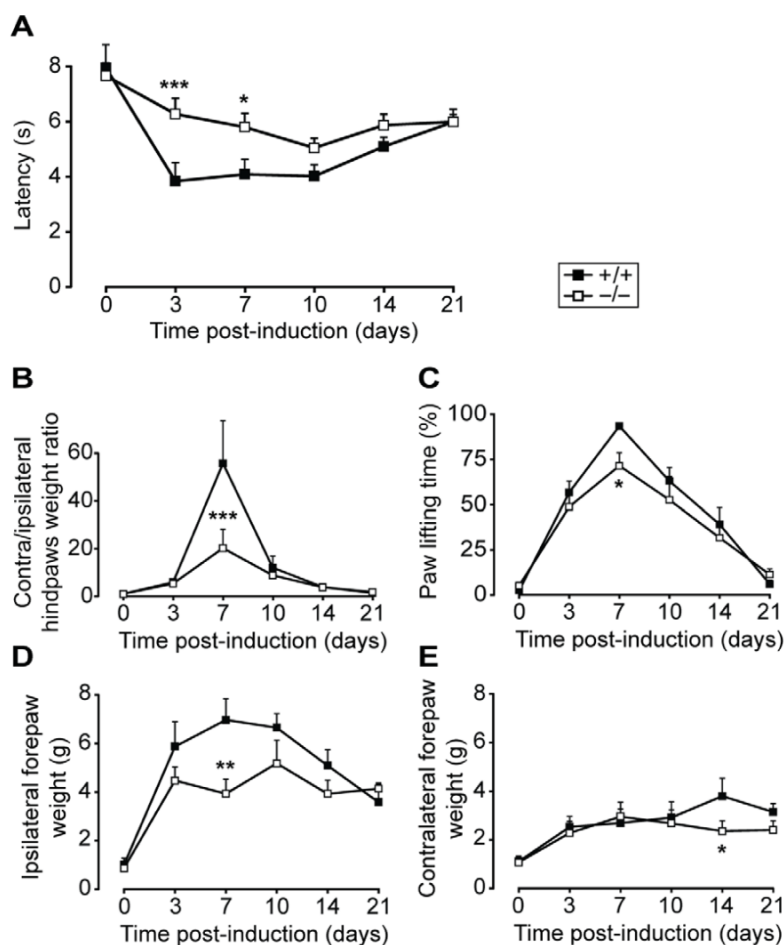


Figure 8. Pain assessment in Nav1.9 knock-out mice following monoarthritis induction. Heat and mechanical pain sensitivity was assessed in Nav1.9^{+/+} and Nav1.9^{-/-} mice (n=8) over 21 days following monoarthritis induction using 46°C paw immersion test up to the ankle (A) and dynamic weight bearing (B–E). Animals were injected in the left ankle. The ipsi/contralateral hindpaw weight ratio is shown in C and the ipsilateral paw lifting time in D. The mean weights applied on ipsilateral and contralateral forepaws are also shown in E and F, respectively. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs ‘+/+’, two way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls all pairwise multiple comparison test. doi:10.1371/journal.pone.0023083.g008

published on mechanical hypersensitivity [15,16,26] may be inherent to the intraplantar CFA model. Such discrepancies between inflammatory models have already been reported

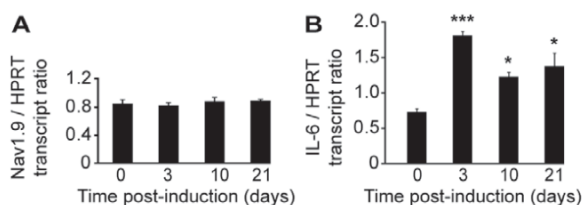


Figure 9. Nav1.9 and IL-6 mRNA expression in mouse lumbar DRGs following monoarthritis induction. Quantitative PCR performed on Nav1.9 (A) and IL-6 (B) transcripts in L4 to L6 ipsilateral DRGs of mice following monoarthritis induction (n=3). Results are given normalized to HPRT transcript levels. *p<0.05, ***p<0.001 vs ‘0’, one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparisons versus control group. doi:10.1371/journal.pone.0023083.g009

between carrageenan and CFA for example, considering either the efficiency of pharmacological P2X₃/P2X_{2/3} receptors inhibition [32], or ASIC3 gene deletion [29], on pain hypersensitivity. Although we could not generalize our conclusions to all the existing inflammatory pain models, taken together our behavioral data give numerous and strong evidences that Nav1.9 participates in lowering heat as well as mechanical pain thresholds during inflammatory states.

In the second part of this study, we assessed Nav1.9 expression in both carrageenan and monoarthritis pain models, as many different studies have reported increased, decreased or stable Nav1.9 mRNA and/or protein expression following peripheral inflammation [5,28,33,16,27,29]. Those fragmented information were furthermore rarely correlated with behavioral data, which is an issue for the functional interpretation of possible expression variations. We therefore performed a time-course study of Nav1.9 expression allowing a correlation with the phenotype observed in animal.

A transient decrease in Nav1.9 protein level was observed in the soma of DRG neurons 8 h following intraplantar carrageenan,

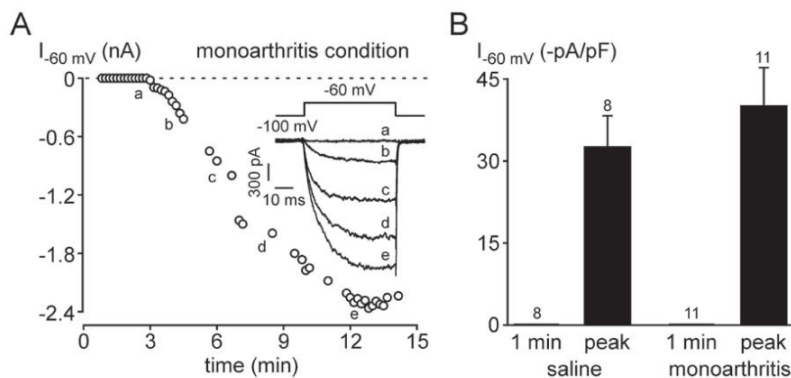


Figure 10. Nav1.9 current properties in the monoarthritis ankle inflammation model. (A) Time-course of Nav1.9 current up-regulation induced by dialysis of fluoride in the monoarthritis condition. Nav1.9 currents are evoked in a DRG neuron (38 pF) by 50 ms-depolarizing steps from -100 to -60 mV every 10 s. The inset shows representative Nav1.9 currents recorded during the time course of the experiment (as indicated). (B) Mean Nav1.9 current evoked at -60 mV 1 min after patch rupturing and at the peak of the up-regulation by internal fluoride. The experiments were performed in DRG neurons from control (injected with saline, left panel) or monoarthritic mice (right panel). The number of cells analyzed is shown on the top of each chart.
doi:10.1371/journal.pone.0023083.g010

whereas upregulation was seen 16–24 h post-injection. These changes in somatal protein level were paralleled with an increase in cutaneous nerve trunks within the inflamed zone 24 h following carrageenan injection. These observations strongly suggest that upon inflammation Nav1.9 protein is exported to the periphery, depleting the cytoplasmic pool of channels present in the cell body of sensory neurons, before an increase in its neosynthesis. No such variation was observed in the monoarthritis model, suggesting either that the observed mechanism takes place during the subacute phase of inflammation only, or that a balance between Nav1.9 production and axonal transport has been reached within the chronic phase. As no change in Nav1.9 current properties was detected in DRG neurons innervating the inflamed paw at a time where Nav1.9 was shown to be upregulated, one can assume that a non-functional pool of channels is kept at the soma level and contributes to the increase in their axonal transport. It has been previously demonstrated that when an inflammatory soup is applied on cultured sensory neurons, the cells present a hyperexcitable behavior involving a strong upregulation of Nav1.9 current [21]. Therefore, we hypothesize that the increase in peripherally located channels may contribute to fibers' excitability directly at the site of inflammation.

Nav1.9 modulation by inflammation could temporally be divided in two steps. First, we propose that a rapid modulation of Nav1.9 channels takes place in axon terminals. This idea is supported by the fact that Nav1.9 is present in nerve endings in physiological conditions [34] and by the fact that in the formalin test Nav1.9 is involved in spontaneous painful behavior as soon as 10 to 15 min post-injection. Nav1.9 was also shown to be involved in mechanical hypersensitivity induced by intraplantar PGE₂ within 15 min [16], and previous electrophysiological studies have revealed rapid modulation of Nav1.9 current following GPCR activation, possibly via a PKC dependent pathway [22,23,24,25]. Secondly, an increase in axonal transport, followed by an upregulation of Nav1.9 channel expression in cell bodies, might take place within the first hours of inflammation as to sustain the excitability of nociceptive terminals.

Changes in Nav1.9 protein expression were not subsequent to modulations in mRNA level, as Nav1.9 transcript remained stable at all time-points tested. Post-transcriptional regulation of VGSCs has been reported previously. For example, Nav1.8 protein but not

the corresponding mRNA has been shown to be upregulated in DRG neurons following colonic inflammation [35]. The non-selective cation channel TRPV1 has also been shown to be massively and unilaterally exported to the periphery 24 h following intraplantar CFA [36], sustained by a post-transcriptional upregulation of the channel expression in DRG cell bodies. This type of regulation may occur at different levels, such as dysregulation of mRNA stability, as shown for the Nav1.7 channel [37], or modulation of its translation by RNA binding proteins, as for the ENaC channel [38].

Regarding to these results, Nav1.9 channel may potentially be a suitable pharmacological target for inflammatory pain care. Complete loss of function, as well as partial silencing, were both able to reduce inflammatory pain hypersensitivity, not depending on the nature of the noxious stimuli, while those treatments had no effect on pain thresholds in healthy animal. Thus, drugs inhibiting Nav1.9 should be considered as potential anti-hyperalgesics rather than analgesics, which is conceptually innovative.

Materials and Methods

Animals

All animals were used in accordance with the European Community guiding in the care and use of animals (86/609/CEE). Since pain might result from these experiments, the guidelines of the Committee for Research and Ethical Issue of the International Association for the Study of Pain [39] were followed. Furthermore, the models used in this study were all approved by the ethics committee of Auvergne (Comité Régional d'Éthique en Matière d'Expérimentation Animale Auvergne; approvals CE13-10, CE09-08 and CE07-08). Great care was taken, particularly to housing conditions, to avoid or minimize discomfort of the animals. Animals were housed under controlled environmental conditions and kept under a 12/12 h light/dark cycle, with food and water *ad libitum*.

Nav1.9 knock-out mice were generated from C57Bl6/J strain as previously described [21]. Briefly, an IRES LacZ-pA cassette starting by a stop codon was inserted between exons 5 and 8 of the *Scn11a* gene, resulting in a depletion of exons 6 and 7 and the production of a non-functional, truncated protein. Behavioral experiments were performed blind to genotype on Nav1.9^{+/+} and

Nav1.9^{-/-} littermates (8–14 weeks) isolated after genotyping on hair samples. Non behavioral experiments were performed on 20–24 g C57Bl6/J mice (Charles River).

Antisense studies were performed on 150–175 g Sprague Dawley rats (Charles River). Prior to experiments, animals received 6 intrathecal injections every 12 h of saline, 12.5 µg mismatch (5'-GCCCTGTCTTTGGACTTCTTC-3') or antisense oligodeoxynucleotides to Nav1.9 (5'-GCTCTGTTCTT-GAGCTTTCTC-3') in 10 µl saline [12].

Inflammatory models

Subacute paw inflammation was induced by intraplantar injection of 20 and 50 µl of 3% λ-carrageenan (Sigma) in mice and rats, respectively. Chronic inflammation (monoarthritis model) was induced under 2% isoflurane anesthesia by two subcutaneous injections of 15 µl around the tibio-tarsal joint of mice with complete Freund adjuvant (CFA), containing 5 µg/µl heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* (Becton, Dickinson and cie) [40]. Indomethacin (Sigma) was injected intraperitoneally at a 1 mg/kg dose from a 0.3 mg/ml suspension in 0.5% methylcellulose.

Behavioral assays

Formalin test. Mice were administered 15 µl of 5% formalin in saline subcutaneously in the left hindpaw. The time spent licking or biting the injected paw was monitored during the two typical phases of nociceptive behavior (0–5 min and 10–45 min post-injection).

Von Frey test. Mechanical pain threshold was assessed using von Frey filaments (BioSeb) calibrated from 0.008 to 4.000 g. The filaments were applied 5 times each, in order of increasing forces, and pressed perpendicularly to the plantar surface of the hindpaw until they bent. The first filament which evoked at least 3 responses was assigned as the pain threshold in grams.

Dynamic weight bearing. The animals' weight distribution on the four limbs was assessed using the dynamic weight bearing test (BioSeb). This new incapitance test consists in a continuous measurement of all pressure points applied by a freely moving animal, allowing a quantitative evaluation of the weight imbalance caused by paw mechanical allodynia. Mice were placed in an 11×11×22 cm cage with a 44×44 sensor cells grid on the floor. The pressure applied on sensor cells by the animal's paws is recorded at a 10 Hz frequency over a 5 min period. Pressure and surface detection thresholds were determined automatically for each animal by the Dynamic weight bearing 1.3.2h software (BioSeb). After the manual attribution of each pressure point to the corresponding paw, the mean weight applied on each paw is calculated. Unilateral pain is finally evaluated through the ipsi/contralateral hindpaws weight ratio, the weight applied on forepaws, and the percentage of time spent raising ipsilateral hindpaw.

Paw pressure test. The rats were submitted to the paw-pressure test previously described by Randall and Selitto [41]. Nociceptive thresholds, expressed in grams, were measured using an Ugo Basil analgesimeter (probe tip diameter 1 mm, Bioseb) by applying an increasing pressure to the hindpaw until vocalisation was elicited. The maximal pressure was set at 450 g.

Paw immersion test

To assess heat pain threshold, mice and rats were gently held and the hindpaw was immersed in a 46°C water bath until withdrawal was observed. The first two consecutive stable withdrawal latencies were averaged out and assigned as the pain

threshold in seconds. A cutoff time of 15 s was applied to avoid injury.

Nav1.9 expression analysis

Real-time PCR. Mice were sacrificed by decapitation under isoflurane anesthesia. Ipsilateral and contralateral DRGs from lumbar segments L4 to L6 were rapidly dissected in 4°C phosphate buffer saline (PBS) and stored at -80°C for subsequent RNA extraction. To ensure sufficient RNA quantity, each assessed sample is the result of a 5 animal DRGs pool. RNA was isolated using RNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer instructions, including a 15 min DNase incubation step. Purified RNA was quantified by measuring the 260 nm absorbance (A260) on a V-550 spectrophotometer (Jasco) and quality was assessed by analyzing the A260/A280 and A260/A230 ratios. Integrity of RNA samples was confirmed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel. Before quantitative PCR analysis, 1 µg of total RNA was submitted to reverse transcription with SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) in a 20 µl volume, using the supplier's procedure. PCR amplifications were performed using a Mastercycler ep realplex (Eppendorf). All samples were run in triplicate in a final volume of 6.3 µl containing 1.3 µl of 1/40 diluted cDNA, 0.5 µM primers, 3 mM MgCl₂ and LightCycler Fast-Start SYBR Green reaction mix (Roche), according to manufacturer protocol. Prior to PCR, an 8 min enzyme activation step was done at 95°C. The PCR protocol consisted of 10 s denaturation at 95°C, 5 s at annealing temperature and 10 s elongation at 72°C for 40 cycles. Optimal annealing temperature was preliminary determined by gradient PCR. The primers sequences used were the following, from 5' to 3': TTCCACTCTACGTACCTTCCGAGT (forward) and ATTC-CCATGAAGAGCTGCTGACCA (reverse) for Nav1.9 (NM_011887, 180 bp); ATGGATGCTACCAACTGGAT (forward) and TGAAGGACTCTGGCTTTGTCT (reverse) for IL-6 (NM_031168, 139 bp); TTGCTGACCTGCTGGATTAC (forward) and AGTTGAGAGATCATCTCCAC (reverse) for HPRT (NM_013556, 149 bp). Amplification specificity was assessed by melting curve analysis and PCR products were run on a 3% agarose gel to confirm amplicons sizes. Primers were designed on intron-flanking sequences to prevent genomic contamination. Nav1.9 and HPRT cDNA relative amounts were calculated function of the samples cycle threshold (Ct) using a standard concentration curve constructed with a serial dilution from 1/10 to 1/640 of a total cDNA mix. For each sample, the relative amount of Nav1.9 cDNA was normalized by the HPRT cDNA amount.

Immunohistochemistry. Beforehand dissection, animals were assessed for mechanical hypersensitivity using von Frey test as described above. DRG and skin samples were quickly removed from freshly killed animals and incubated for 1 h in PBS containing 4% sucrose, and then incubated for at least one hour in PBS plus 15% sucrose. Tissues were then embedded in Tissue-TEK OCT compound (Miles Inc.) and frozen in -60°C dry-ice cooled isopentane. 14 µm thick serial sections were performed with a HM500M Microm cryostat and set down on Superfrost Plus slides. Unspecific binding was reduced by pre-incubating samples in blocking buffer consisting of 3% Bovine Serum Albumin (BSA) and 0.1% triton X-100 in PBS for 1 h. Primary antibodies were incubated in blocking buffer without triton X-100 overnight at 4°C. After several washes in PBS, secondary antibodies were incubated in PBS containing 3% BSA for 1 h at room temperature. After several washes in PBS, sections were mounted in Mowiol. Antibody dilutions were: anti-Nav1.9 L23, 1/400 [34]; anti-peripherin, 1/400 (Chemicon). Goat anti-rabbit

IgG Alexa Fluor 488 (1/400, Molecular Probes) and goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 546 (1/400, Molecular Probes) were used as secondary antibodies. Optical conventional fluorescence microscopy was performed on an Olympus microscope equipped with CellR acquisition software (Olympus). Structured illumination microscopy, for skin images, was performed on the ApoTome system (Zeiss). Image editing was performed using Adobe Photoshop (Adobe Systems).

Fluorescence quantification. Nav1.9 fluorescence signal was quantified with cellR software (Olympus). For each animal, immunostaining of ipsi and contralateral DRG sections were performed simultaneously with the same batch of antibody. Pictures were recorded with the same acquisition parameters, paying attention to avoid any saturation of the signal. Pictures were taken as 8 bit images with 256 (from 0 to 255) possible grey levels. Around a hundred neurons were analysed for each contra and ipsilateral DRG. Mean grey value was measured on a 5.3 μm diameter ROI (Region Of Interest). For each image, mean background was also measured with three ROI, and subtracted to the Nav1.9 fluorescence signal.

Electrophysiology

Acutely dissociated DRG cells. DRG neurons innervating skin from young male mice were labeled by the fluorescent dye DiI (5 repetitive subcutaneous injections of 1 μl in 5% DMSO, Molecular Probes). Dye was injected 3 days before injection of saline, carrageenan, or CFA, depending of the considered model. Beforehand dissection, mechanical hypersensitivity was assessed as described above. In the carrageenan and monoarthritis models, mice were sacrificed respectively 20 h and 7 days after the induction of the inflammation. Dissociation of DRG neurons was performed as been previously described [42,21]. Briefly, lumbar ipsilateral L4 to L6 DRGs were dissected and incubated in Hank's balanced salt solution (HBSS, Invitrogen) containing collagenase IA (2 mg/ml, Sigma) for 45 min at 37°C. DRGs were then triturated using a fired polished Pasteur pipette in HBSS medium and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with heat-inactivated fetal calf serum (10%), penicillin-streptomycin (100 units/ml), L-glutamine (2 mM), Nerve Growth Factor (25 ng/ml, Gibco) and Glial Derived Neurotrophic Factor (2 ng/ml, Gibco). Cells were maintained in a humidified atmosphere (5% CO₂, 37°C) for 3–6 h before recording.

Patch clamp recordings. Whole-cell voltage clamp recordings were made at room temperature (20–24°C) using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments), filtered at 2 kHz

and digitally sampled at 20–50 kHz using PCLAMP 8.02 software. Currents were leak subtracted using a P/6 protocol. Voltage errors were minimized using 70–85% series resistance compensation. Patch pipettes (1.9–2.5 M Ω) contained (in mM): 100 CsCl, 30 CsF, 8 NaCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 EGTA, 10 Hepes, 4 MgATP, 0.4 Na₂GTP (pH 7.2, 300 mOsm/l). Bath solution had a reduced driving force for Na⁺ and contained (in mM): 60 NaCl, 110 sucrose, 3 KCl, 1 MgCl₂, 10 Hepes, 2.5 CaCl₂, 10 glucose, 10 TEA-Cl, 0.0005 TTX, 0.005 LaCl₃, 1 amiloride (pH 7.4, 305 mOsm/l). All chemicals were obtained from Sigma except TTX (Alomone Labs). DRG neurons were perfused with bath solution at a flow rate of 2.5 ml/min.

Data analysis

Raw data were analyzed for statistical significance using either one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparisons versus control group, two-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls all pairwise multiple comparison procedure, Student's unpaired t-test or Mann-Whitney test (SigmaPlot) depending on the experimental design. For a better understanding, the tests used are indicated in the corresponding figure legend. All values are shown as mean \pm standard error of the mean (SEM).

Supporting Information

Figure S1 Carrageenan and monoarthritis-induced oedema monitoring in Nav1.9^{-/-} mice. Paw edema induced by intraplantar carrageenan was measured from 0 to 24 h post-injection using a micrometer in Nav1.9^{-/-} and Nav1.9^{+/+} mice (A, n=9). Ankle swelling following monoarthritis induction was measured from 0 to 21 days post-CFA injection in Nav1.9^{-/-} and Nav1.9^{+/+} mice (B, n=8). No significant difference occurred between genotypes in both models, assessed by two-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls all pairwise multiple comparison test. (TIF)

Acknowledgments

We would like to thank Axel Fernandez for expert technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SL FM FP AE PD JB. Performed the experiments: SL MA FM FP MG EC. Analyzed the data: SL MA FM FP. Wrote the paper: SL FM FP AE PD JB.

References

- Woolf CJ, Costigan M (1999) Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7723–7730.
- Lai J, Porreca F, Hunter JC, Gold MS (2004) Voltage-gated sodium channels and hyperalgesia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 371–397.
- Akopian AN, Sivilotti L, Wood JN (1996) A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature* 379: 257–262.
- Dib-Hajj SD, Tyrrell L, Black JA, Waxman SG (1998) Nav, a novel voltage-gated sodium channel, is expressed preferentially in peripheral sensory neurons and down-regulated after axotomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8963–8968.
- Tate S, Bann S, Hick C, Trezise D, John V, et al. (1998) Two sodium channels contribute to the ttx-r sodium current in primary sensory neurons. *Nat Neurosci* 1: 653–655.
- Persson AK, Black JA, Gasser A, Fischer T, Waxman SG (2010) Sodium-calcium exchanger and multiple sodium channel isoforms in intra-epidermal nerve terminals. *Mol Pain* 6: 84.
- Sangameswaran L, Delgado SG, Fish LM, Koch BD, Jakeman LB, et al. (1996) Structure and function of a novel voltage-gated, tetrodotoxin-resistant sodium channel specific to sensory neurons. *J Biol Chem* 271: 5953–5956.
- Renganathan M, Cummins TR, Waxman SG (2001) Contribution of Nav1.8 sodium channels to action potential electrogenesis in DRG neurons. *J Neurophysiol* 86: 629–640.
- Blair NT, Bean BP (2002) Roles of tetrodotoxin (Ttx)-sensitive Na⁺ current, Ttx-resistant Na⁺ current, and Ca²⁺ current in the action potentials of nociceptive sensory neurons. *J Neurosci* 22: 10277–10290.
- Khasar SG, Gold MS, Levine JD (1998) A tetrodotoxin-resistant sodium current mediates inflammatory pain in the rat. *Neurosci Lett* 256: 17–20.
- Akopian AN, Souslova V, England S, Okuse K, Ogata N, et al. (1999) The tetrodotoxin-resistant sodium channel *sns* has a specialized function in pain pathways. *Nat Neurosci* 2: 541–548.
- Porreca F, Lai J, Bian D, Wegert S, Ossipov MH, et al. (1999) A comparison of the potential role of the tetrodotoxin-insensitive sodium channels, *pn3/sns* and *nan/sns2*, in rat models of chronic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7640–7644.
- Lai J, Gold MS, Kim CS, Bian D, Ossipov MH, et al. (2002) Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, *nav1.8*. *Pain* 95: 143–152.
- Joshi SK, Mikusa JP, Hernandez G, Baker S, Shieh CC, et al. (2006) Involvement of the ttx-resistant sodium channel *nav 1.8* in inflammatory and neuropathic, but not post-operative, pain states. *Pain* 123: 75–82.

15. Priest BT, Murphy BA, Lindia JA, Diaz C, Abbadie C, et al. (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: 9382–9387.
16. Amaya F, Wang H, Costigan M, Allchorne AJ, Hatcher JP, et al. (2006) The voltage-gated sodium channel na(v)1.9 is an effector of peripheral inflammatory pain hypersensitivity. *J Neurosci* 26: 12852–12860.
17. Dib-Hajj S, Black JA, Cummins TR, Waxman SG (2002) Nav1.9: a sodium channel with unique properties. *Trends Neurosci* 25: 253–259.
18. Cummins TR, Dib-Hajj SD, Black JA, Akopian AN, Wood JN, et al. (1999) A novel persistent tetrodotoxin-resistant sodium current in sns-null and wild-type small primary sensory neurons. *J Neurosci* 19: RC43.
19. Coste B, Osorio N, Padilla F, Crest M, Delmas P (2004) Gating and modulation of presumptive nav1.9 channels in enteric and spinal sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* 26: 123–134.
20. Herzog RI, Cummins TR, Waxman SG (2001) Persistent ttx-resistant na⁺ current affects resting potential and response to depolarization in simulated spinal sensory neurons. *J Neurophysiol* 86: 1351–1364.
21. Maingret F, Coste B, Padilla F, Clerc N, Crest M, et al. (2008) Inflammatory mediators increase nav1.9 current and excitability in nociceptors through a coincident detection mechanism. *J Gen Physiol* 131: 211–225.
22. Baker MD, Chandra SY, Ding Y, Waxman SG, Wood JN (2003) Gtp-induced tetrodotoxin-resistant na⁺ current regulates excitability in mouse and rat small diameter sensory neurones. *J Physiol* 548: 373–382.
23. Rush AM, Waxman SG (2004) Pge2 increases the tetrodotoxin-resistant nav1.9 sodium current in mouse drg neurons via g-proteins. *Brain Res* 1023: 264–271.
24. Baker MD (2005) Protein kinase c mediates up-regulation of tetrodotoxin-resistant, persistent na⁺ current in rat and mouse sensory neurones. *J Physiol* 567: 851–867.
25. Ostman JAR, Nassar MA, Wood JN, Baker MD (2008) Gtp up-regulated persistent na⁺ current and enhanced nociceptor excitability require nav1.9. *J Physiol* 586: 1077–1087.
26. Leo S, D'Hooge R, Meert T (2010) Exploring the role of nociceptor-specific sodium channels in pain transmission using nav1.8 and nav1.9 knockout mice. *Behav Brain Res* 208: 149–157.
27. Strickland IT, Martindale JC, Woodhams PL, Reeve AJ, Chessell IP, et al. (2008) Changes in the expression of nav1.7, nav1.8 and nav1.9 in a distinct population of dorsal root ganglia innervating the rat knee joint in a model of chronic inflammatory joint pain. *Eur J Pain* 12: 564–572.
28. Black JA, Liu S, Tanaka M, Cummins TR, Waxman SG (2004) Changes in the expression of tetrodotoxin-sensitive sodium channels within dorsal root ganglia neurons in inflammatory pain. *Pain* 108: 237–247.
29. Yen YT, Tu PH, Chen CJ, Lin YW, Hsieh ST, et al. (2009) Role of acid-sensing ion channel 3 in sub-acute-phase inflammation. *Mol Pain* 5: 1.
30. Craner MJ, Klein JP, Renganathan M, Black JA, Waxman SG (2002) Changes of sodium channel expression in experimental painful diabetic neuropathy. *Ann Neurol* 52: 786–792.
31. Martinez V, Melgar S (2008) Lack of colonic-inflammation-induced acute visceral hypersensitivity to colorectal distension in nav1.9 knockout mice. *Eur J Pain* 12: 934–944.
32. McGaraughty S, Wismer CT, Zhu CZ, Mikusa J, Honore P, et al. (2003) Effects of a-317491, a novel and selective p2x3/p2x2/3 receptor antagonist, on neuropathic, inflammatory and chemogenic nociception following intrathecal and intraplantar administration. *Br J Pharmacol* 140: 1381–1388.
33. Coggeshall RE, Tate S, Carlton SM (2004) Differential expression of tetrodotoxin-resistant sodium channels nav1.8 and nav1.9 in normal and inflamed rats. *Neurosci Lett* 355: 45–48.
34. Padilla F, Couble ML, Coste B, Maingret F, Clerc N, et al. (2007) Expression and localization of the nav1.9 sodium channel in enteric neurons and in trigeminal sensory endings: implication for intestinal reflex function and orofacial pain. *Mol Cell Neurosci* 35: 138–152.
35. King DE, Macleod RJ, Vanner SJ (2009) Trinitrobenzenesulphonic acid colitis alters na 1.8 channel expression in mouse dorsal root ganglia neurons. *Neurogastroenterol Motil* 21: e80–e84.
36. Ji RR, Samad TA, Jin SX, Schmolz R, Woolf CJ (2002) p38 mapk activation by ngf in primary sensory neurons after inflammation increases trpv1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron* 36: 57–68.
37. Wada A, Yanagita T, Yokoo H, Kobayashi H (2004) Regulation of cell surface expression of voltage-dependent nav1.7 sodium channels: mrna stability and posttranscriptional control in adrenal chromaffin cells. *Front Biosci* 9: 1954–1966.
38. Perlewitz A, Nafz B, Skalweit A, Föhling M, Persson PB, et al. (2010) Aldosterone and vasopressin affect alpha- and gamma-enac mrna translation. *Nucleic Acids Res* 38: 5746–5760.
39. Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16: 109–110.
40. Chillingworth NL, Donaldson LF (2003) Characterisation of a Freund's complete adjuvant-induced model of chronic arthritis in mice. *J Neurosci Methods* 128: 45–52.
41. Randall LO, Selitto JJ (1957) A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 111: 409–419.
42. Coste B, Crest M, Delmas P (2007) Pharmacological dissection and distribution of nav1.9, t-type ca2⁺ currents, and mechanically activated cation currents in different populations of drg neurons. *J Gen Physiol* 129: 57–77.



***CONTRIBUTION DU CANAL
NAV1.9 A LA PERCEPTION DU
FROID NOCICEPTIF ET A
L'HYPERSENSIBILITE
DOULOUREUSE INDUITE PAR
L'OXALIPLATINE***



I. INTRODUCTION

Le froid peut perturber et ralentir des fonctions cellulaires vitales, comme les activités enzymatiques, faute d'agitation moléculaire suffisante. Au niveau du système nerveux périphérique, cela peut se traduire par des difficultés motrices ou par une diminution de la sensibilité somesthésique (engourdissement). Au même titre que l'excès de chaleur, l'organisme doit donc se protéger contre les températures froides extrêmes. Pour cela, le système nociceptif périphérique a non seulement la particularité de rester actif à basse température, mais peut aussi être directement activé par le froid et générer une sensation douloureuse, parfois qualifiée de "morsure".

Ce second volet de la thèse porte sur la compréhension des mécanismes physiopathologiques responsables de la sensibilité nociceptive au froid et sur le rôle joué par le canal Nav1.9 dans ces derniers. L'introduction qui suit a pour but de faire le point sur les connaissances actuelles des mécanismes moléculaires permettant aux nocicepteurs de détecter le froid et de fonctionner à basse température. Dans un deuxième temps, nous décrivons l'hypersensibilité au froid induite par chimiothérapie à l'oxaliplatine, modèle pathologique utilisé pour ce travail.

1. LES ACTEURS MOLECULAIRES DE LA SENSIBILITE AU FROID PHYSIOLOGIQUE

Si les mécanismes moléculaires qui régissent la sensibilité au froid sont encore peu connus, deux canaux de la famille des TRP ont été identifiés comme étant les principaux acteurs de cette modalité sensorielle. Le canal TRPM8, activé par de légères baisses de température, semble contribuer à la perception du froid non nociceptif, mais continue à jouer un rôle lorsqu'une température nociceptive est atteinte (McKemy et al. 2002; Peier et al. 2002; Colburn et al. 2007). Le canal TRPA1 serait quant à lui beaucoup plus spécifique du froid nociceptif (Story et al., 2003; Kwan et al., 2006), bien que son rôle dans ce processus fasse encore l'objet de controverses. La contribution des canaux potassiques TREK-1 et TRAAK à la sensibilité au froid modéré a également été démontrée plus récemment (Noël et al. 2009). Enfin, le canal Nav1.8 serait également un acteur important de la sensibilité au froid nociceptif. Sa capacité à rester actif à de très basses températures permettrait notamment aux nocicepteurs d'être fonctionnels à des températures pour lesquelles le système somesthésique non

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine

Introduction

nociceptif a tendance à être inhibé (Zimmermann et al., 2007). Ces différents acteurs vont être développés plus en détail au cours des chapitres suivants.

1.1. TRPM8

Le canal TRPM8 est un homotétramère dont les sous-unités sont composées de 6 segments transmembranaires. Les parties N- et C-terminales sont intra-cytoplasmiques. Le pore du canal est constitué par l'espace laissé ouvert entre les segments S5 et S6.

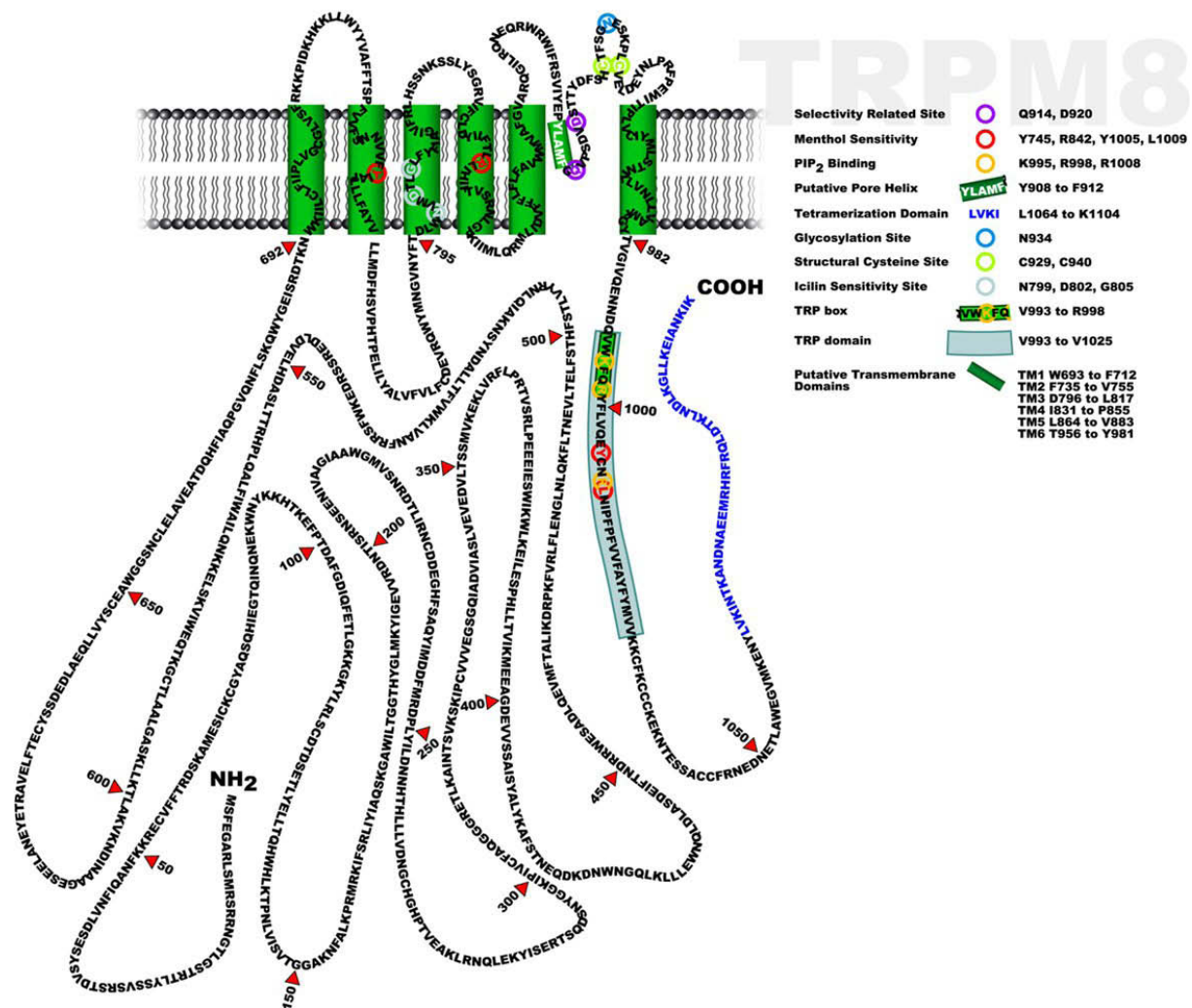


Figure 35. Le canal TRPM8 de rat.

Les 4 segments S1 à S4 contiennent les sites de liaison au menthol et à l'icilin, qui sont distincts. Les segments S5 et S6 forment le pore du canal et contiennent des sites de glycosylation. Le domaine C-terminal intervient dans la tétramérisation du canal (Latorre et al., 2007).

Ce canal est le premier dont l'implication dans la transduction du froid a été décrite. La paternité de cette découverte est double, puisque les équipes de David Julius et d'Ardem Patapoutian

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine

Introduction

publient l'information respectivement dans *Nature* le 7 mars 2002 et dans *Cell* le 8 mars de la même année (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002a).

Le premier article est le résultat d'un crible d'environ 10000 ADNc (Acide Désoxyribonucléique copie) issus du TG (connu pour contenir un grand nombre de neurones sensibles au froid en comparaison des DRG) réalisé en imagerie calcique sur des cellules HEK293 transfectées. Les auteurs identifient au sein de cette population un gène dont l'expression est responsable d'un courant cationique à dominante calcique, généré en réponse au menthol, à l'iciline (200 fois plus puissant que le menthol), ainsi qu'à l'eucalyptol dans une moindre mesure. Le froid est également capable d'activer directement ce nouveau récepteur, dès 25,8°C, avec un effet de saturation observé à partir de 8,2°C. La conservation de ces propriétés lorsque le gène est exprimé en œuf de Xénope permet de conclure que ce récepteur sous-tend lui-même le courant induit par le froid et qu'il est donc un transducteur à part entière, au même titre que TRPV1 peut l'être pour le chaud. Il est alors baptisé CMR1, pour Cold-Menthol Receptor type 1. L'expression de ce canal dans les petites fibres du TG et des DRG est de plus compatible avec un rôle dans la transduction du froid par les FAP, et peut-être dans la nociception.

Dans la seconde étude, c'est par analogie de séquence avec le canal TRPV1 que le nouveau récepteur-canal est identifié. Les auteurs le nomment TRPM8 (M pour melastin), appellation la plus couramment employée aujourd'hui. Le seuil d'activation est déterminé cette fois-ci aux environs de 23°C, avec une forte augmentation du courant calcique autour de 15°C. Les auteurs montrent que le transcrite TRPM8 est retrouvé dans 5 à 10% des neurones des DRG et du TG chez la souris adulte, dont le diamètre correspondrait majoritairement à des fibres de type C. Son expression est entièrement restreinte aux neurones TrkA-positifs. Aucune colocalisation n'a été observée avec IB4 ou TRPV1, ni même avec le CGRP, pourtant largement exprimé au sein de la population TrkA-positive. La non-colocalisation de TRPM8 et de TRPV1 doit être pondérée par le fait que dans la première étude (McKemy et al., 2002), la moitié des neurones de DRG sensibles au froid et au menthol répondent également à la capsaïcine. Cette observation a depuis été confirmée (Babes et al., 2004; Xing et al., 2006) malgré des résultats toujours contradictoires concernant l'expression des canaux TRPM8 et TRPV1, montrant soit une absence (Kobayashi et al., 2005) soit une présence (Okazawa et al., 2004) de fibres co-exprimant ces deux récepteurs (voir Figure 36).

Les premières études réalisées chez des souris KO ont permis de confirmer l'importance du canal TRPM8 dans la perception du froid *in vivo*. Les animaux KO, laissés sur une plaque produisant un gradient de température de 15 à 53°C, montrent une gamme de confort plus large vers le froid (de 23 à 38°C) que les WT (de 32 à 38°C, Dhaka et al., 2007). Cela dit, l'évitement des zones très froides est conservé, montrant que le canal TRPM8 n'est pas le seul acteur de la sensibilité au froid, du moins

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine

Introduction

pour des températures inférieures à 20°C. Le canal TRPM8 serait donc plutôt impliqué dans la perception du froid non nociceptif que nociceptif. Ceci est confirmé par la diminution de la réponse des souris KO à l'application d'une goutte d'acétone sur la patte (refroidissement modéré) alors que la latence de retrait de la patte sur une plaque froide à -1°C est identique à celle observée chez les souris sauvages. Diana Bautista et al. (2007) confirment ces résultats sur une souche différente de souris TRPM8^{-/-}. Sur un test de préférence thermique (mesure du temps passé sur une plaque à 30°C vs une plaque dont la température est définie par l'expérimentateur), les souris KO perdent la capacité de discrimination entre 30 et 25°C, et entre 30 et 20°C. Au-delà, et jusqu'à 30/5°C, les souris KO TRPM8 montrent un évitement de la plaque froide moins important que les souris WT. Le comportement des souris TRPM8^{-/-} ne diffère cependant pas de celui des souris WT lorsqu'elles sont déposées sur une plaque froide à 0, -5 ou -10°C.

D'autres études vont impliquer le canal TRPM8 dans la perception du froid nociceptif. Sur une souche KO différente de celle décrite ci-dessus, Raymond Colburn et al. (2007) montrent une augmentation de la latence de réponse des souris KO sur une plaque à 0°C, sans préciser la nature de la réponse observée. De plus, lorsque l'on laisse ces souris circuler librement entre deux plaques respectivement à température ambiante et 5°C, elles montrent une légère préférence pour la plaque à 5°C, sur laquelle les souris WT ne passent pas plus de 10% du temps expérimental. Une autre étude montre que les souris KO TRPM8 présentent un temps de retrait augmenté lorsque la patte est appliquée sur une plaque à 10°C (Gentry et al., 2010).

Les activateurs du canal, tels que le menthol ou l'iciline, vont également induire un comportement à caractère nociceptif chez l'animal. L'injection intraplantaire de l'un ou l'autre provoque en effet le léchage de la patte injectée sur une courte période (<5 min), suivie d'une hypersensibilité au froid à des températures de 1 ou 10°C pendant 30 à 60 min (Dhaka et al., 2007; Gentry et al., 2010). Bien que le menthol et l'iciline ne soient pas spécifiques de TRPM8 (pouvant chacun aussi activer TRPA1, Karashima et al., 2007; Story et al., 2003), cette sensibilisation n'existe pas chez les souris KO TRPM8. L'iciline injectée par voie intrapéritonéale produit également des sauts chez les souris WT, mais pas chez les souris KO (Colburn et al., 2007).

En conclusion, le canal TRPM8 est sans ambiguïté un transducteur direct du froid, il est suffisant pour générer un courant dépolarisant en réponse à une baisse de température modérée (<25°C). *In vivo*, il participe de façon évidente à la perception du froid non nociceptif. Les choses sont moins claires en ce qui concerne sa contribution à la perception du froid nociceptif, les résultats comportementaux à ce sujet étant contradictoires.

1.2. TRPA1

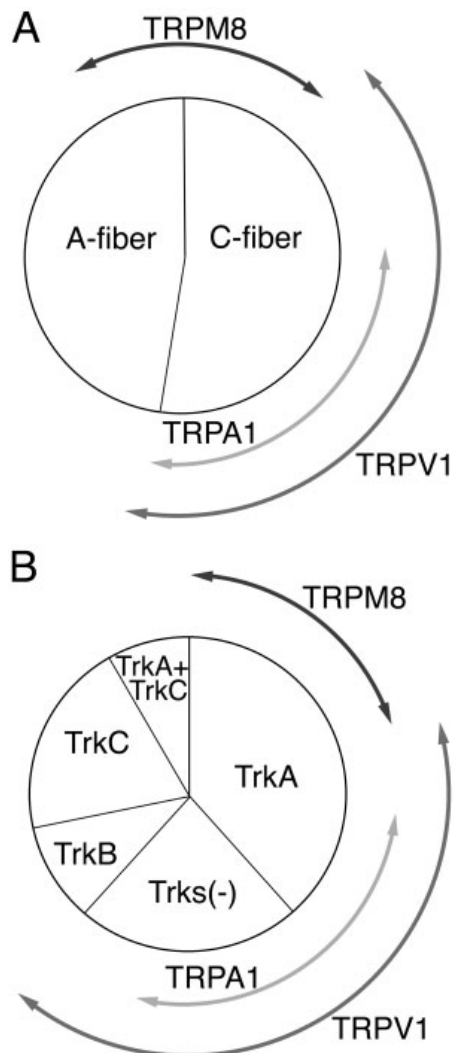


Figure 36. Distribution des canaux TRPM8, TRPA1 et TRPV1 dans les différents types de fibres afférentes primaires.

Réalisé par hybridation *in situ* dans les DRG de rat (Kobayashi et al., 2005).

Un an après la publication du canal TRPM8, l'équipe d'Ardem Patapoutian récidive avec un nouveau canal nommé ANKTM1 (pour ankyrin-like with transmembrane domains 1), lui aussi activé par le froid (Story et al., 2003). L'ankyrine est un motif de 33 acides aminés fréquemment répété dans les canaux TRP. C'est donc à nouveau par approche bioinformatique, en recherchant ces répétitions dans une banque d'ADNc codant pour des protéines prédites à 6 segments transmembranaires, que TRPA1 a été identifié. Une analyse de son expression par northern blot chez la souris n'a permis d'identifier le transcrite TRPA1 que dans les DRG et le TG. L'hybridation *in situ* a ensuite permis de définir qu'il était exprimé par des neurones de petit calibre (3,6% de la population total) co-exprimant le CGRP et la SP. Une autre étude a montré la colocalisation du canal TRPA1 avec des marqueurs peptidergiques mais aussi non peptidergiques (IB4, Kim et al., 2010). Contrairement à TRPM8, TRPA1 est très fortement colocalisé avec le canal TRPV1 (97% des fibres TRPA1-positives expriment TRPV1, et 30% des fibres TRPV1-positives expriment le canal TRPA1), et aucune colocalisation n'a été observée entre les deux transducteurs du froid. Ce résultat sera confirmé par une étude ultérieure (Kobayashi et al., 2005, voir Figure 36).

Ces données pèsent donc fortement en faveur d'un rôle différent des canaux TRPM8 et TRPA1 dans la perception du froid, le second étant compatible avec un rôle dans la sensibilité au froid nociceptif. La température d'activation du canal TRPA1 va dans ce sens puisque le clone du canal dans une lignée de cellules ovariennes de hamster chinois (cellules CHO pour "Chinese Hamster Ovary") produit un courant calcique à partir de températures pouvant aller de 12 à 24°C (17,5°C en moyenne) contre 19 à 24°C pour TRPM8 (22,5°C en moyenne). Or, la sensation de douleur au froid est décrite

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine

Introduction

chez l'Homme à partir de 15°C (Davis et Pope, 2002). Le canal TRPA1 est bloqué par le rouge de ruthénium (bloqueur non spécifique de certains canaux calciques dont les canaux TRPV thermosensibles) et par le camphre (Xu et al., 2005). Comme TRPM8, TRPA1 est activé par le menthol et l'iciline, mais à des concentrations plus élevées et avec un retard cinétique (Karashima et al., 2007; Story et al., 2003). Le canal TRPA1 est préférentiellement activé par des composés âcres, piquants, ou irritants tels que le cinnamaldéhyde (présent à l'état naturel dans l'écorce de cannelle), l'isothiocyanate d'allyle (AITC, responsable du goût piquant du radis, de la moutarde ou du wasabi, raifort japonais, également activateur du canal TRPV1, Everaerts et al., 2011), l'eugénol (contenu dans le clou de girofle), l'allicine (contenu dans l'ail), le gingérol (issu de la racine de gingembre) et le salicylate de méthyle (produit par plusieurs végétaux comme la gaulthérie couchée), les deux premiers composés étant très spécifique du canal TRPA1 (Bandell et al., 2004). Les irritants volatiles, comme l'acroléine, le peroxyde d'hydrogène, le formaldéhyde (produits de combustion, notamment de la cigarette) activent aussi le canal (Bautista et al., 2006). TRPA1 est également activé par la bradykinine de manière indirecte via la PLC, impliquant potentiellement un effet direct du diacylglycérol ou de l'acide arachidonique produits par cette dernière. Les cannabinoïdes (cannabinol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol) sont aussi capables d'activer ce canal (Jordt et al., 2004), ainsi que diverses espèces oxygénées réactives (Andersson et al., 2008). La gamme d'activateurs potentiels de TRPA1 est donc extrêmement large, et ce canal est souvent également considéré comme un "récepteur de l'irritation".

L'implication du canal TRPA1 dans la perception de froid intense est cependant assez critiquée et fait l'objet de controverses (McKemy, 2005). Sven-Eric Jordt et al. (2004) montrent que 96% des neurones sensibles à l'huile de moutarde (largement utilisée dans la bibliographie comme activateur des canaux TRPA1) ne sont pas activés par un refroidissement à 5°C. D'autres études ne montrent pas d'activation cellulaire en réponse au froid dans un système d'expression hétérologue de TRPA1 (Nagata et al., 2005), ou pas d'activation neuronale par l'huile de moutarde dans la population de neurones de DRG sensible au froid et insensible au menthol (Babes et al., 2004). Cela dit, suite à une stimulation froide nociceptive chez le rat, une forte colocalisation entre TRPA1 et la protéine p38 phosphorylée est retrouvée, même si le rôle du canal dans cette activation neuronale n'est pas directement établi (Mizushima et al., 2006).

La génération de souris KO TRPA1 n'a non seulement pas permis de clarifier les choses, mais va de plus entretenir la controverse. Deux études extrêmement contradictoires sont en effet publiées quasi-simultanément. La première (Bautista et al., 2006) ne montre aucun effet de la délétion du canal dans la sensibilité au froid intense (cold plate de 10 à -10°C) ou modéré (application sous-plantaire

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine

Introduction

d'acétone). La seconde (Kwan et al., 2006), utilisant sensiblement les mêmes tests (cold plate à 0°C et acétone), établit un rôle clair de TRPA1 dans la sensibilité au froid intense comme modéré (plus prononcé encore chez les souris femelles). Dans cette seconde étude, les auteurs montrent également que la sensibilité mécanique (test de von Frey) des souris KO est diminuée, ce qui fait également de TRPA1 un senseur mécanique potentiel. Ce dernier résultat sera confirmé par la suite grâce à la technique de nerf-peau chez ces mêmes souris TRPA1^{-/-} alors que de manière surprenante, l'activité des fibres TRPA1^{-/-} en réponse au froid (2°C) est inchangée (Kwan et al., 2009). Ce résultat va dans le sens d'une autre étude montrant que la délétion du gène codant TRPA1, contrairement à TRPM8, n'a pas d'effet sur l'activation neuronale médullaire, visualisée par marquage Fos dans les cornes dorsales suite à une stimulation froide (0°C) répétée (Knowlton et al., 2010). En isolant le canal lors d'une expérience de patch-clamp en configuration inside-out, Yosuke Sawada et al. (2007) montrent une corrélation inverse entre la probabilité d'ouverture du canal TRPA1 et la température. Les auteurs expliquent que les résultats négatifs obtenus dans certaines études précédentes pourraient être dus à plusieurs facteurs comme la préparation des cellules, la présence de NGF dans les milieux de culture, ou encore et surtout un temps de stimulation trop court (les auteurs ont pratiqué des stimulations de 5 min). Il est donc montré que dans certaines conditions expérimentales, le canal TRPA1 peut générer un courant dépolarisant en réponse à un refroidissement important. Deux nouvelles études, réalisées *in vivo* chez les souris TRPA1^{-/-}, ont depuis été publiées et plaident toutes deux en faveur d'une implication du canal dans la perception du froid nociceptif. La première (Gentry et al., 2010) montre que les souris TRPA1^{-/-} présentent une latence de retrait de la patte plus élevée que les souris WT lorsque celle-ci est appliquée sur une plaque à 10°C. La souche de souris utilisée étant la même que celle utilisée par Diana Bautista et al. (2006), qui avaient publié des résultats négatifs, on peut éliminer un éventuel "effet souche" dans la discordance des résultats. La seconde étude (Karashima et al., 2009) montre que certains neurones du TG activables par le froid (10°C) et par l'huile de moutarde ne sont plus observés chez les souris TRPA1^{-/-}. *In vivo*, cela se traduit par une diminution du nombre de sauts sur une plaque à 0°C pendant 2 min, alors que la latence avant le premier comportement relié à la perception du froid (*i.e.* le frottement des pattes avant entre elles et sur le museau) n'est pas différente entre les génotypes. Ceci montre que la sensibilité au froid n'est pas modifiée chez les animaux déficients pour TRPA1, mais que le comportement résultant de son caractère nociceptif est très fortement réduit, voir absent. De manière similaire, il est montré dans la même étude par le test d'immersion de la queue à -10°C (utilisant un mélange eau-méthanol) que le canal TRPA1 est essentiel pour ressentir le froid nociceptif, même sur un test impliquant un réflexe spinal. La vascularisation cutanée s'opposant constamment à la baisse de température au niveau du derme (et de l'épiderme

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine

Introduction

par conduction), l'implication du canal TRPA1 peut très bien n'être visible qu'à des températures imposées bien inférieures aux températures permettant d'activer le canal en système d'expression hétérologue, ou si le refroidissement est prolongé de manière à amener les terminaisons nociceptives à une température suffisamment basse. Les auteurs montrent de plus que la cinétique d'activation des neurones sensibles à la fois au froid et à l'huile de moutarde est clairement plus longue que celle de neurones sensibles au menthol.

Un autre mécanisme a été proposé pour expliquer ces résultats divergents, notamment entre les études *in vivo* et *in vitro*. TRPA1 pourrait être activé de manière indirecte par le relargage intracellulaire de calcium qui suit l'exposition au froid plutôt que par le froid lui-même. En effet, Paul Thut et al. (2003) ont montré une augmentation du calcium cytosolique dans les neurones de TG sensibles au froid, même dans un environnement déplété en calcium extracellulaire. Ce relargage proviendrait donc des stocks intracellulaires, même si rien n'est connu sur le mécanisme conduisant à cette libération de calcium, ni sur son origine précise (surtout si l'on se replace dans le contexte d'une terminaison axonale). TRPA1 étant activé par une hausse du calcium intracellulaire, il n'est pas exclu que son rôle dans la transduction du froid soit en aval de cette libération calcique (Zurborg et al., 2007).

En conclusion, si la contribution du canal TRPA1 dans la perception du froid nociceptif ne fait toujours pas consensus en raison de la discordance des études, il a été montré que TRPM8 et TRPA1 ne sont de toute façon pas suffisants pour expliquer les mécanismes responsables de la transduction du froid. En effet, Clare Munns et al. (2007) ont montré qu'un tiers des neurones des DRG de souris sensibles au froid ne répondaient ni au menthol (34% des neurones sensibles au froid), ni à l'huile de moutarde (18%). Un ou d'autres senseurs doivent donc être requis pour transduire la douleur en réponse au froid.

1.3. TREK-1/TREK-2/TRAAK

C'est en 2001 que Reid & Flonta émettent l'hypothèse que des canaux potassiques seraient impliqués dans la transduction du froid. Sur des cultures primaires de neurones de DRG, ils notent une inhibition d'un courant potassique de fond dans certains neurones lorsqu'ils sont exposés à un refroidissement léger (20°C)¹⁹. Cette observation est confirmée par Félix Viana et al. (2002) sur des neurones de TG. Ces derniers montrent la présence d'un courant potassique de fond inhibé par le

¹⁹ Ce courant hyperpolarisant est présent dans les neurones au repos et contribue à maintenir un état hyperpolarisé à température physiologique. Son inhibition par le froid entraînerait donc une dépolarisation et une excitation neuronale.

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine

Introduction

froid dans les cellules sensibles au refroidissement. Dans les cellules insensibles au froid, un courant différent (I_{K_D}) agirait comme un "frein" à l'excitabilité neuronale. En effet, en bloquant ce courant sensible à la 4-aminopyridine, les neurones deviennent sensibles au froid et sont capables d'émettre des PA suite à un refroidissement. La même équipe a plus tard montré que le seuil d'activation des neurones de TG par le froid était lié à une balance entre l'expression du canal TRPM8 (facilitateur de l'activation) et des canaux potassiques dépendants du voltage Kv1, responsables du courant I_{K_D} et induisant un décalage du seuil d'activation vers des températures plus froides (Madrid et al., 2009).

Plusieurs acteurs moléculaires de la famille K2P (canaux potassiques à deux domaines pore) déjà connus pour leur sensibilité à l'étirement membranaire (Patel et Honoré, 2001) pourraient être à l'origine du courant I_h inhibé par le froid. Le premier, TREK-1, est en effet activé par le chaud et son courant hyperpolarisant est en conséquence inhibé par les températures froides (Maingret et al., 2000). Le canal transfecté en œuf de xénope produit un courant qui augmente avec la température, de 25 à 37°C. Les canaux TREK-2 et TRAAK sont également activés par le chaud, avec des seuils respectifs de 25 et 31°C (Kang et al., 2005). Ces canaux, tous présents dans les DRG (Maingret et al., 2000; Kang et Kim, 2006), sont donc actifs à la température physiologique, produisant un courant de fond hyperpolarisant. Une baisse de température serait alors capable, par l'inhibition de ce courant, d'exciter les neurones qui expriment ces canaux K2P (voir Figure 37).

In vivo, les souris KO TRAAK et KO TREK-1 (Alloui et al., 2006; Noël et al., 2009) sont hypersensibles au chaud (de 44 à 50°C sur le test d'immersion de la queue) et à la pression (von Frey). La délétion simultanée de ces deux canaux va en plus être à l'origine d'une hypersensibilité au froid modéré (plaque froide à 10, 15 et 20°C et préférence thermique à 30/21, 30/18 et 30/15°C, Noël et al., 2009). Pour les températures plus basses (plaque froide à 5°C et préférence thermique à 30/12°C), la différence n'existe plus avec les souris sauvages, ce qui impliquerait plutôt ces canaux dans la sensibilité au froid non nociceptif. Chez ces animaux double KO (et pas chez les KO TREK-1 ou TRAAK simples), le pourcentage de fibres répondant au froid passe de 24 à 54. La population neuronale la plus touchée par cette augmentation est la population de fibres sensibles au froid mais pas au menthol ni à l'AITC (*i.e.* TRPM8- et TRPA1-négatives), déjà mise en évidence par Clare Munns et al. (2007). De manière intéressante, les auteurs montrent également grâce à une expérience de nerf peau que la bimodalité des fibres C sensibles au froid (soit leur capacité à être activée par des températures froides modérées, puis très basses) est perdue chez les souris double KO. En effet, seules des fibres à bas seuil d'activation (entre 30 et 18°C) sont identifiables chez ces animaux. L'hypothèse avancée par les auteurs serait que chez les doubles KO, les fibres sensibles au froid intense verraient leur seuil d'activation abaissé à un niveau équivalent à celui des fibres impliquées dans la sensibilité thermique

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine

Introduction

non-nociceptive. En conséquence, les animaux éprouveraient une douleur pour des refroidissements perceptibles mais normalement non nociceptifs. Cela est en accord avec l'hypersensibilité au froid modéré observée *in vivo* chez les souris double KO TREK-1/TRAAK.

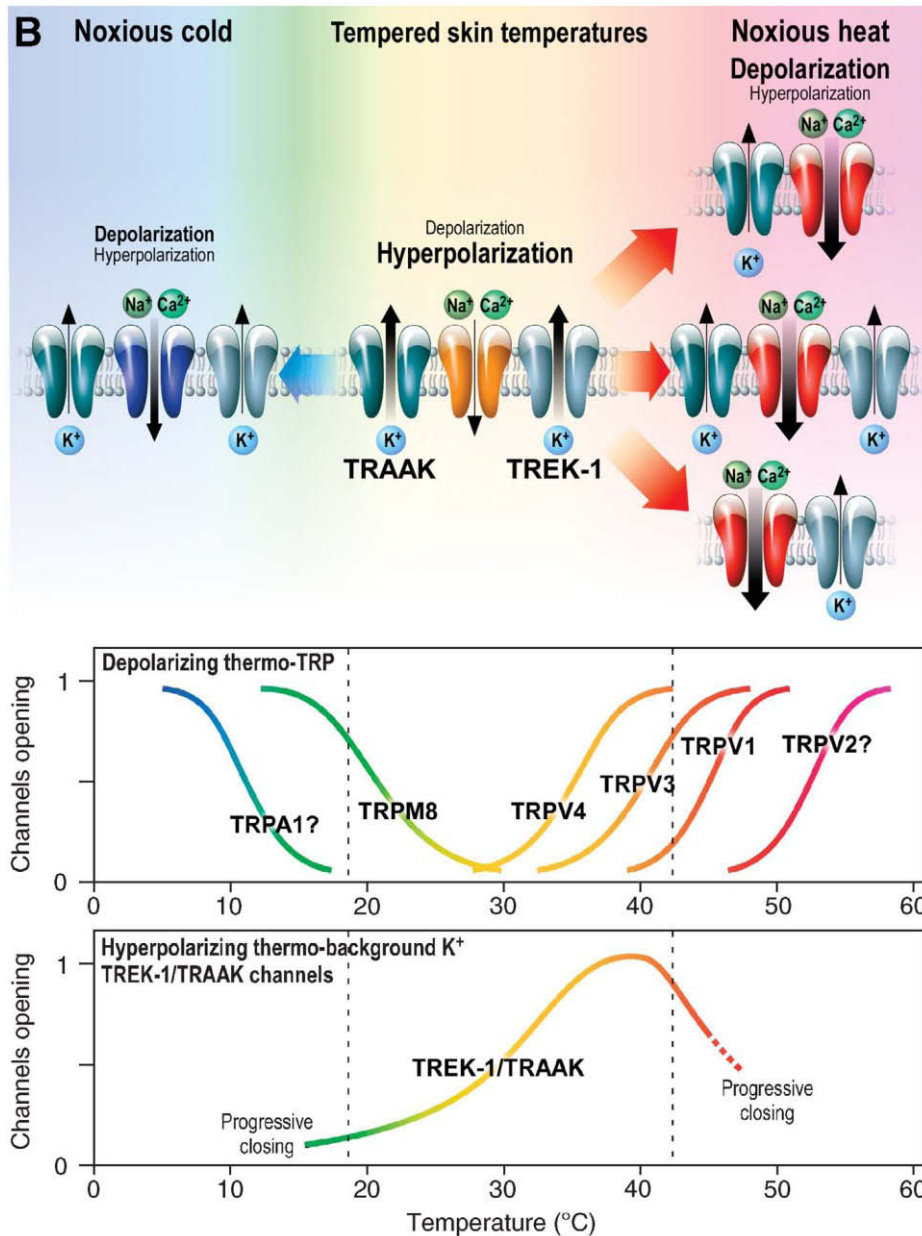


Figure 37. Mécanisme présumé impliquant les canaux TREK-1 et TRAAK dans la transduction du froid.

Dans la partie haute de la figure est représentée l'activité des canaux TREK-1 et TRAAK, ainsi que celle des canaux dépolarisants thermosensibles, en fonction de la température. L'hyperpolarisation induite par les canaux K^{2P} est dominante à température physiologique. Lors d'un refroidissement (ou d'un réchauffement), l'activité des canaux hyperpolarisants diminue tandis que celle des canaux dépolarisants thermosensibles (*i.e.* les canaux TRP) augmente et prend le dessus. Les différentes combinaisons montrées dans le cas d'un réchauffement illustrent le fait que les canaux dépolarisants peuvent être associés à TREK-1 ou TRAAK seuls, ou bien les deux, alors que la présence des deux canaux est nécessaire à une thermosensation normale dans les températures physiologique et en dessous. La deuxième partie de la figure représente la probabilité d'ouverture des canaux TRP thermosensibles et de TREK-1/TRAAK, dont dépend directement le courant résultant. (Noël et al., 2009)

1.4. Nav1.8

Ce n'est que récemment que l'on a découvert que le canal sodique Nav1.8 participait également à la sensibilité au froid (Zimmermann et al., 2007). Son implication est cependant différente de celle des canaux cités précédemment puisque Nav1.8 est impliqué non pas dans la transduction directe des stimuli thermiques froid, mais dans l'excitabilité des terminaisons nerveuses nociceptives soumises à un refroidissement. En effet, dans ces conditions, l'inactivation lente des canaux Nav TTX-S augmente²⁰, ce qui a pour conséquence de diminuer le courant sodique entrant suite à une dépolarisation membranaire. Ce phénomène est observé pour les canaux TTX-S, mais pas pour le canal TTX-R Nav1.8 dont les propriétés d'inactivation ne sont pas modifiées par le froid. Nav1.8 participant à la phase dépolarisante du PA au même titre que les canaux TTX-S (Renganathan et al., 2001; Blair et Bean, 2002) et étant exprimé majoritairement dans les nocicepteurs (Akopian et al., 1996; Dib-Hajj et al., 1996; Tate et al., 1998), il permettrait à ces derniers de conserver leur activité lors d'un refroidissement important. En effet, si les neurones Nav1.8^{-/-} restent activables à 30°C, bien que le courant nécessaire à leur activation soit multiplié par deux par rapport aux neurones WT, aucun PA n'est émis à 10°C par les neurones issus d'animaux KO, et ce quel que soit l'intensité du courant injecté dans les cellules. Nav1.8 serait donc indispensable à la genèse de PA à ces températures froides. Ceci est confirmé par une expérience de nerf-peau lors de laquelle les auteurs ont constaté que le froid ne réduisait que légèrement les décharges émises par les FAP en réponse à une stimulation mécanique cutanée (von Frey), tandis que chez les souris KO Nav1.8, la réponse des fibres à cette même stimulation était quasiment abolie à 10°C. Les auteurs (Zimmermann et al., 2007) montrent de plus que si les propriétés d'inactivation du canal Nav1.8 sont entièrement résistantes au froid, son activation est facilitée à basse température. Ce canal serait alors non seulement indispensable à la génération de PA à basse température, mais faciliterait de plus l'excitabilité neuronale dans ce contexte. *In vivo*, et dans cette même étude (Zimmermann et al., 2007), les souris Nav1.8^{-/-} effectuent enfin 5 fois moins de sauts lorsqu'elles sont déposées sur une plaque à 0°C par rapport à leurs congénères WT. Dans une dernière étude (Abrahamsen et al., 2008), la destruction de tous les neurones exprimant Nav1.8 grâce à l'expression spécifique de la toxine diphtérique au sein de ces

²⁰ L'inactivation lente des canaux TTX-S est déplacée vers des potentiels plus négatifs (hyperpolarisés), ce qui signifie que pour un potentiel donné (et donc au potentiel de repos), plus de canaux seront inactivés, et le courant induit par une dépolarisation sera en conséquence plus faible. Ce constat est réalisé en imposant différents potentiels (-120 à 0 mV) aux neurones pendant 30 s pour l'inactivation, suivi d'une courte dépolarisation (-10 ou 0 mV) pour l'activation.

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine

Introduction

derniers²¹ conduit à une suppression de la sensibilité douloureuse au froid (plaque à 0°C) sans impacter la sensibilité au chaud nociceptif (Hargreaves test, plaque à 50 et 55°C). Tous ces résultats montrent que le canal Nav1.8 est un acteur majeur de la sensibilité au froid intense, via des propriétés électrophysiologiques exceptionnelles, indispensables à l'excitabilité des nocicepteurs à basse température.

La sensibilité au froid est donc un système complexe nécessitant la présence de plusieurs acteurs moléculaires dont certains restent encore inconnus. Ce système est lui aussi soumis à certains dérèglements pathologiques pouvant causer une hypersensibilité au froid. Le chapitre suivant a pour but de faire le point sur le cas de l'oxaliplatine, un agent anticancéreux connu pour sa neurotoxicité sensorielle périphérique très invalidante chez une forte proportion des patients traités, avec l'apparition caractéristique d'une hypersensibilité au froid. En conséquence, nous avons choisi l'oxaliplatine comme modèle d'étude de l'hypersensibilité au froid dans ce deuxième volet de la thèse.

2. L'HYPERSENSIBILITE AU FROID IATROGENE : CAS DE L'OXALIPLATINE

Les chimiothérapies anticancéreuses sont des traitements qui visent à limiter la prolifération des cellules malignes en combinant une forte cytotoxicité avec une sélectivité (relative) pour ces cellules. La caractéristique principale et commune à toutes les cellules cancéreuses étant leur forte activité mitotique, beaucoup d'agents chimiothérapeutiques ciblent cette activité en bloquant la réplication de l'ADN (formation d'adduits sur l'ADN²², blocage des topoisomérases²³, blocage d'enzymes impliquées dans la phase S du cycle cellulaire ou en amont²⁴) ou la division cellulaire

²¹ Ceci est réalisé en croisant des souris exprimant la recombinaise Cre sous promoteur Nav1.8 avec des souris possédant le gène codant la toxine diphtérique précédé d'un codon stop floxé. L'expression de Cre dans les neurones Nav1.8-positifs va permettre l'expression de la toxine via l'excision du codon stop, ce qui va conduire à l'extinction totale de cette population neuronale.

²² Les adduits sont des liaisons covalentes entre deux nucléotides. Ceci perturbe la conformation de l'ADN et peut bloquer sa réplication. Les agents alkylants comme les sels de platine sont responsables de la formation d'adduits sur l'ADN.

²³ Classe d'enzymes responsables de la conformation topologique de l'ADN, capables d'en moduler l'enroulement et la torsion. Elles interviennent dans tous les processus nécessitant une modification structurale de la double hélice d'ADN, comme la réplication, la transcription ou la recombinaison.

²⁴ Les anti-métabolites miment des bases puriques ou pyrimidiques et permettent de bloquer certaines enzymes impliquées dans la phase S du cycle cellulaire (comme l'ADN polymérase) ou dans les voies de biosynthèses des nucléotides ou de leurs précurseurs.

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine

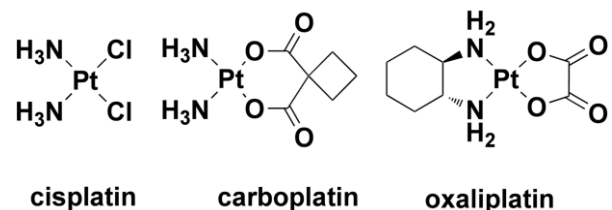
Introduction

(déstabilisation des faisceaux de microtubules par des alcaloïdes végétaux). Le principal problème de ces différentes stratégies est qu'elles perturbent toutes des mécanismes biologiques fondamentaux, communs à toutes les cellules de l'organisme. Les chimiothérapies anticancéreuses sont donc responsables d'effets secondaires considérables, impliquant principalement l'atteinte de tissus à forte activité mitotique (moelle osseuse, tissu lymphoïde, épithélium intestinal, follicules pileux...) et pouvant provoquer anémie, thrombopénie, immunosuppression, troubles gastro-intestinaux et alopecie. D'autres tissus peuvent également souffrir de la toxicité des traitements chimiothérapeutiques, comme le tissu nerveux. Le système nerveux périphérique n'étant pas protégé par la barrière hémato-méningée, il est plus exposé à la toxicité de ces médicaments et l'on constate l'apparition de neuropathies iatrogènes périphériques plus ou moins fréquentes selon la nature et la dose de la chimiothérapie (Windebank et Grisold, 2008; Wolf et al., 2008).

2.1. Neurotoxicité sensorielle de l'oxaliplatine : constat clinique

L'oxaliplatine (Eloxatine®) est un sel de platine de troisième génération (voir Figure 38) indiqué principalement dans le traitement des cancers colorectaux métastasés, souvent en association avec le 5-fluorouracile (analogue pyrimidique inhibiteur de la thymidylate synthase,

enzyme indispensable à la biosynthèse de la désoxythymidine triphosphate). L'oxaliplatine est constitué d'un atome de platine lié à ligand transporteur diaminocyclohexane (DACH, à gauche sur la Figure 38) et d'un groupement oxalate hydrolysable (à droite). Après hydrolyse de l'oxalate, remplacé par deux ions chlore, la molécule devient active sous forme diaminocyclohexane-dichloro-platine (voir Figure 39). Ce dernier est un agent alkylant qui induit la formation d'adduits sur l'ADN, principalement guanine-guanine ou guanine-adénine à la fois inter- et intra-brin. Ceci a pour conséquence le blocage de la réplication et de la transcription, ainsi que l'induction de l'apoptose (Gamelin et al., 2006; Ang et al., 2010).



cisplatin carboplatin oxaliplatin

Figure 38. Structures des sels de platine de première (cisplatine), deuxième (carboplatine) et troisième (oxaliplatine) génération.

(Ang et al., 2010)

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine

Introduction

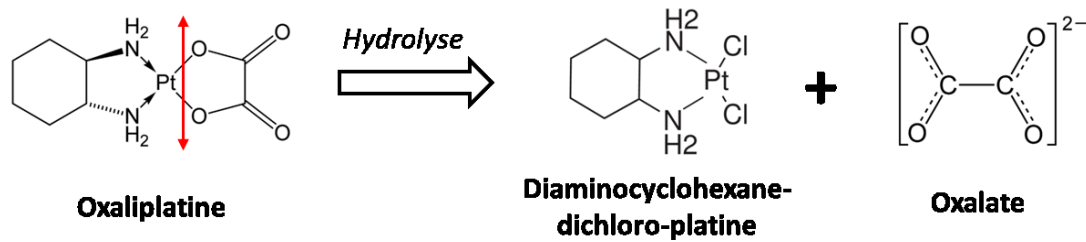


Figure 39. Métabolisme de l'oxaliplatine.

Contrairement aux deux générations précédentes de sels de platine, l'oxaliplatine a l'intérêt de ne pas présenter de toxicité rénale, hématologique ou auditive, tout en conservant de puissantes propriétés antinéoplasiques, y compris contre des tumeurs résistantes au cisplatine (Raymond et al., 1998; de Gramont et al., 2000; Kiernan, 2007). Il induit cependant, en plus d'une neurotoxicité chronique²⁵ cliniquement semblable à celle induite par le cisplatine, une neurotoxicité aiguë particulière. Dès la première intraveineuse, et selon la dose et le débit de perfusion, 80 à 96% des patients présentent en effet des paresthésies²⁶ et des dysesthésies²⁷ déclenchées ou exacerbées par le froid au niveau des mains, des pieds, et de la région péri-orale (Gamelin et al., 2006; Kiernan, 2007; Attal et al., 2009). La langue et la région pharyngolaryngée peuvent également être touchées. L'ingestion de liquide ou l'inspiration d'air froid peut entraîner une gêne allant jusqu'à une sensation d'étouffement. L'hypersensibilité au froid est le symptôme le plus souvent rapporté par les patients souffrant de cette neuropathie aiguë (28/33 patients, Toftagen et al., 2011) et est classée parmi les symptômes occasionnant le plus de souffrance. Plus rarement, les symptômes sensoriels peuvent être accompagnés par des symptômes moteurs (contractures, raideur, faiblesse musculaire). Dans la plupart des cas, tous ces symptômes régressent en quelques jours, mais leur durée et leur intensité augmentent avec la répétition des cures. Les paresthésies sont particulièrement sujettes à ce phénomène d'exacerbation et peuvent s'installer dans la durée jusqu'à perdurer complètement entre deux cures de chimiothérapie (classiquement espacées de deux semaines pour une perfusion à 85 mg/m² ou 3 semaines à 135 mg/m², pendant 6 mois). Cette neurotoxicité aiguë est le facteur limitant du traitement et peut conduire à une diminution de la posologie, voir même à un arrêt prématuré du traitement. Outre l'altération majeure de la qualité de vie des patients suivant une chimiothérapie, la neurotoxicité aiguë de l'oxaliplatine peut donc également constituer un véritable obstacle thérapeutique.

²⁵ On parle de neuropathie périphérique puisque l'oxaliplatine ne passe pas la barrière hémato-méningée.

²⁶ Troubles désagréables mais non douloureux de la sensibilité, se traduisant par une perception anormale des stimuli (nature, localisation) et à l'origine de sensations qualifiées de picotements, de fourmillements ou d'engourdissements.

²⁷ Altération de la sensibilité (hypoesthésie/hyperesthésie) pouvant conduire à une hypoalgie, une hyperalgie, ou une allodynie (douleur ressentie en réponse à une stimulation normalement non douloureuse).

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine

Introduction

La neurotoxicité chronique, cumulative, de l'oxaliplatine touche quant à elle 15 à 20% des patients et apparaît après 6 mois de traitement, la fréquence et la sévérité de ses symptômes étant dépendants de la dose cumulée. Les symptômes sont proches de ceux induits par l'oxaliplatine sur le mode aigu. Elle s'accompagne aussi d'ataxie sensorielle et d'un déficit proprioceptif rendant compliquée la manipulation d'objets (difficultés pour écrire, s'habiller, conduire...), ainsi que de douleurs spontanées continues ou paroxystiques. Des paresthésies sont également présentes, et une gêne au niveau des pieds est souvent constatée. L'amélioration de la symptomatologie survient dans un délai de 3 mois suivant l'arrêt du traitement chez 75% des patients et est plus souvent réversible que la neurotoxicité du cisplatine (de Gramont et al., 2000). Cependant, certains patients vont connaître une récupération beaucoup plus longue, voir aucune amélioration de leurs symptômes durant 5 années de suivi après la dernière cure pour des dose cumulées importantes (Pietrangeli et al., 2006; Land et al., 2007).

Les toxicités aiguës et chroniques de l'oxaliplatine, si elles présentent des caractères différents (durée, réversibilité, présence d'hyposensibilité, zones touchées, intensité de la douleur...), ne sont cependant pas considérées comme deux pathologies complètement distinctes. En effet, Nadine Attal et al. (2009) ont montré que l'intensité des symptômes ressentis sur le mode aigu lors des premières cures de chimiothérapies (hypersensibilité thermique, en particulier au froid) était un critère prédictif de la probabilité d'apparition et de l'intensité d'une neuropathie. Les neurotoxicités aiguë et chronique semblent donc partager certains mécanismes, ou du moins exploiter des critères de susceptibilité communs chez les malades. Une avancée dans la compréhension de la neurotoxicité aiguë de l'oxaliplatine pourrait permettre de mieux comprendre comment celle-ci évolue en neuropathie chronique, et peut-être également d'en limiter l'impact.

2.2. Les mécanismes sous-jacents

L'oxaliplatine étant une molécule d'utilisation récente, introduite en clinique dans les années 1990, les mécanismes biologiques à l'origine des symptômes neurosensoriels qu'il induit sont encore très mal connus et les traitements restent empiriques. Ces symptômes sont résistants aux antalgiques conventionnels, mais quelques thérapies alternatives se sont avérées relativement efficaces, donnant par la même des éléments de réponse quant aux mécanismes à l'origine de cette neurotoxicité.

La **N-acétylcystéine**, l'**acide α -lipoïque**, l'**amifostine** et le **glutathion réduit**, intervenant dans la détoxification des espèces oxygénées réactives, permettent de réduire l'occurrence des symptômes douloureux lorsqu'administrés juste avant les cures de chimiothérapie (Ali, 2010). Une étude

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine

Introduction

préclinique a montré que le rôle du stress oxydatif dans la neurotoxicité de l'oxaliplatine pouvait impliquer le canal TRPA1, senseur de diverses espèces oxygénées réactives (Nassini et al., 2011). Les auteurs montrent que l'oxaliplatine induit une activation des canaux TRPA1 en cellules CHO, et que cette activation est abolie par le glutathion. *In vivo*, les souris TRPA1^{-/-} ne montrent plus d'allodynie mécanique (von Frey) ou au froid (acétone).

D'autres traitements, agissant sur l'activité des canaux Nav se sont également montrés efficaces. Les perfusions de Mg^{2+}/Ca^{2+} permettent une amélioration significative des symptômes et une diminution de l'occurrence de la neuropathie. L'explication avancée serait que l'oxalate, métabolite de l'oxaliplatine, perturberait la fonction des canaux Nav en modifiant la charge de la membrane par son action de chélateur des cations divalents, et particulièrement du calcium extracellulaire (Gamelin et al., 2007). Chez les patients, 24 à 48 h après la perfusion d'oxaliplatine, on observe une hyperexcitabilité des neurones moteurs qualifiée de canalopathie par Tanya Lehy et al. (2004). Les neurones sensoriels voient également leur excitabilité augmenter, avec une réduction de la période réfractaire impliquant les canaux Nav (Park et al., 2009, 2011). Chez le rat, l'oxaliplatine augmente la taille et la durée des PA, augmente le courant sodique dans les neurones des DRG, et déplace la dépendance au voltage de ce courant vers des valeurs plus négatives (Adelsberger et al., 2000). Ces derniers effets ne sont pas observés dans des neurones issus de l'hippocampe, suggérant une implication différentielle de différents sous-types de canaux Nav. Les auteurs montrent également que la carbamazépine permet de réverser l'effet de l'oxaliplatine sur les courants sodiques. Chez l'Homme comme chez le rat, aucune efficacité de la carbamazépine n'a cependant pu être démontrée (Ling et al., 2007a; Ali, 2010). La gabapentine, qui cible quant à elle les canaux calciques voltage-dépendants, n'a pas non plus prouvé son efficacité chez l'Homme, même si une diminution de l'allodynie au froid a été observée chez le rat.

Concernant la chronicisation des symptômes induits par l'oxaliplatine, l'augmentation des composés platinés dans les DRG est souvent avancée (Argyriou et al., 2008). Le tropisme particulier des composés platinés pour les DRG pourrait impliquer le transporteur de cuivre CTR1, participant fortement à l'accumulation intracellulaire de platine en modèle cellulaire (Holzer et al., 2006). Les conséquences fonctionnelles directes pour les FAP ne sont pas connues mais différentes hypothèses existent. Un dysfonctionnement mitochondrial, à la source d'une augmentation du stress oxydant, pourrait avoir lieu. Ceci va dans le sens des études citées précédemment, impliquant une augmentation des espèces oxygénées réactives dans la génération des symptômes neurosensoriels induits par l'oxaliplatine. Les neurones IB4-positifs seraient particulièrement impliqués dans cette sensibilisation par le stress oxydant (Joseph et al., 2008). Des études vont également dans le sens

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine

Introduction

d'une implication des canaux ioniques dépendant du voltage (voir ci-dessus) ou de la température (canaux TRP). Juliette Descoeur et al. (2011) ont montré récemment que l'oxaliplatine pouvait induire un remodelage important de l'expression des canaux ioniques périphériques, impliquant de nombreux senseurs du froid comme les canaux K2P TREK-1 et TRAAK, le canal TRPA1, mais aussi des canaux sodiques et potassiques dépendants du voltage comme Kv1.1 ou Nav1.8. Le canal HCN1 (perméable aux cations, activé par l'hyperpolarisation et les nucléotides cycliques) est également proposé comme acteur de la neurotoxicité de l'oxaliplatine. L'ivabradine (inhibiteur des canaux HCN) est en effet capable de réverser l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine, spécifiquement. La sensibilité au froid et à la pression des souris double KO TREK-1/TRAAK n'est pas modifiée par l'oxaliplatine, même s'il faut noter que ces animaux présentent une hypersensibilité intrinsèque pour ces deux modalités de stimulation. Une étude précédente a permis de montrer la surexpression du canal TRPM8 dans les DRG de souris 3 jours après l'injection d'oxaliplatine (Gauchan et al., 2009). Juliette Descoeur et al. (2011) ont par la suite montré l'absence d'allodynie au froid chez des souris TRPM8^{-/-} (résultat à pondérer par le déficit de sensibilité au froid que présentent ces animaux en conditions physiologiques), alors que l'hypersensibilité mécanique se développe normalement. Enfin, il a récemment été publié qu'un antagoniste spécifique du canal TRPM8, le PBMC (pour 1-phenylethyl-4-(benzyloxy)-3-methoxybenzyl(2-aminoethyl)carbamate), ne permettait pas de réduire l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine chez la souris (Knowlton et al., 2011). Cependant, la dose utilisée est limitée par l'effet hypothermisant de ce dernier.

Les mécanismes périphériques conduisant à l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine sont donc encore obscures. Cependant, les études existantes semblent montrer qu'un remodelage de l'expression de certains canaux transducteurs ou dépendants du voltage a lieu dans les FAP. De plus, des dérèglements physiologiques (homéostasie calcique, stress oxydant) pourraient moduler l'activité de ces mêmes canaux, incluant des canaux Nav. Un des objectifs de ce travail est de déterminer dans quelle proportion l'isoforme Nav1.9 peut être impliquée dans l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine.

II. OBJECTIFS

La connaissance des acteurs moléculaires de la sensibilité au froid est à l'heure actuelle très incomplète et tous les acteurs n'ont pas encore été identifiés. Suite à la découverte inattendue que nous avons faite de l'implication du canal Nav1.9 dans la perception du froid nociceptif, l'objectif premier de cette deuxième partie de la thèse est la réalisation d'un phénotypage complet, permettant de déterminer précisément dans quelle mesure le canal Nav1.9 participe effectivement à la sensibilité au froid. Dans un deuxième temps, nous nous intéressons à sa contribution aux dérèglements pathologiques de la sensibilité au froid induits par l'oxaliplatine, un agent anticancéreux connu pour induire une hypersensibilité au froid très invalidante chez la majorité des patients traités. Ce travail a donc pour objectifs la caractérisation du canal Nav1.9 en tant que nouvel acteur de la sensibilité au froid ainsi que l'évaluation de son intérêt comme cible pharmacologique dans le traitement de l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine.

Tout d'abord, le rôle du canal Nav1.9 dans la sensibilité au froid est évalué chez des souris KO Nav1.9 sur une large gamme de température pour définir précisément sa zone d'implication. Le phénotype d'hyposensibilité au froid observé chez ces animaux est ensuite exploré par plusieurs tests de sensibilité thermique, et l'expression des différents canaux senseurs du froid connus est analysée par qPCR pour exclure un éventuel phénomène compensatoire. Dans le même but, la contribution du canal Nav1.9 à la sensibilité au froid est également observée chez le rat traité par antisens anti-Nav1.9. Dans un deuxième temps, nous étudions le rôle joué par ce canal dans l'hypersensibilité au froid pathologique. Pour cela, une injection unique d'oxaliplatine est réalisée chez des souris KO Nav1.9 et des rats traités par antisens, puis plusieurs tests de sensibilité thermique, mais aussi mécanique, sont réalisés. L'expression du canal Nav1.9 est enfin évaluée dans ce modèle.

III. RESULTATS

1. ROLE DU CANAL NAV1.9 DANS LA SENSIBILITE AU FROID

La première expérience réalisée, et qui est le point de départ de tout ce travail, est un phénotypage des souris KO Nav1.9 en termes de sensibilité thermique. Pour cela, les animaux sont soumis au test d'immersion de la queue à plusieurs températures recouvrant une gamme de 0°C à 50°C (voir Figure 40). Il apparaît que les animaux KO Nav1.9 ont la même sensibilité au chaud, en accord avec les données existantes et avec la première partie de cette thèse. En revanche, une hyposensibilité au froid marquée est observée chez les souris KO aux températures de 0 et 5°C, avec un doublement de la latence de retrait de la queue. La différence entre les génotypes n'est pas plus importante à 0°C qu'à 5°C, température pour laquelle l'effet maximal est donc déjà atteint. A la température de 10°C, une différence non significative est observable, signe que le canal Nav1.9 est impliqué dans la sensibilité au froid à partir d'une température comprise entre 5°C et environ 10°C.

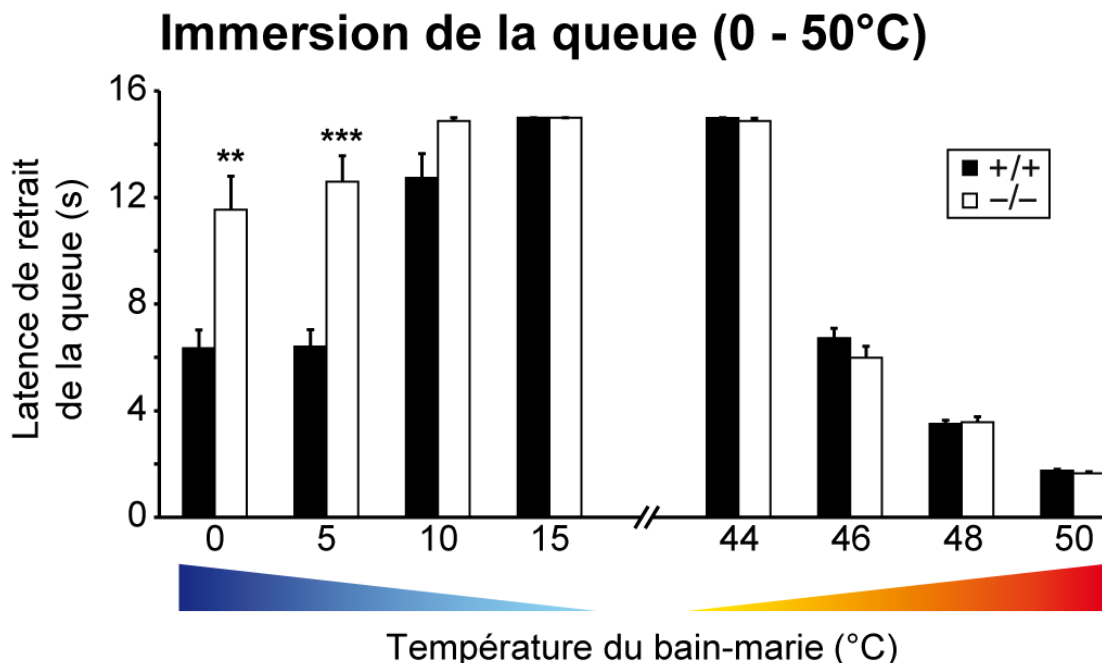


Figure 40. Sensibilité thermique des souris KO Nav1.9.

Des souris WT et KO Nav1.9 ont été soumises au test d'immersion de la queue à différentes températures, allant de 0 à 50°C. Les résultats obtenus à 20, 25, 30, 35 et 40°C ne sont pas représentés car les seuils sont équivalents au cut-off, défini à 15 s. **p<0,01 ***p<0,001 vs '+/+', Mann & Whitney rank sum test, n=16 (-/-), n=24 (+/+)

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine

Résultats

Pour déterminer avec plus de précision le seuil de température à partir duquel le canal Nav1.9 est impliqué dans la douleur au froid, nous avons réalisé le test de la rampe froide qui consiste à placer les animaux sur une plaque dont la température diminue de 25 à 0°C à la vitesse de 1°C/min et à comptabiliser les sauts réalisés par tranche de 1°C (voir Figure 41). Chez les souris WT, on observe 3 pics de sauts aux températures de 11-12°C, 6-7°C et 1-2°C, dont l'intensité croît avec la diminution de la température (respectivement $1,5 \pm 0,5$; $2,9 \pm 0,8$; $4,6 \pm 1,1$ sauts). Chez les souris KO Nav1.9, seul un pic d'intensité moyenne ($2,2 \pm 0,6$ sauts) est observé pour une température de 3-4°C. Pour toutes les températures inférieures à 3°C, la différence est significative entre les groupes (ainsi qu'aux températures correspondant aux 2 premiers pics de sauts chez les souris WT). La différence est également significative si l'on cumule le nombre de sauts (voir insert Figure 41A et Figure 41B). Les souris KO Nav1.9 présenteraient donc à la fois un décalage du seuil de nociception vers des valeurs plus négatives, et une diminution de l'intensité de la réponse nociceptive.

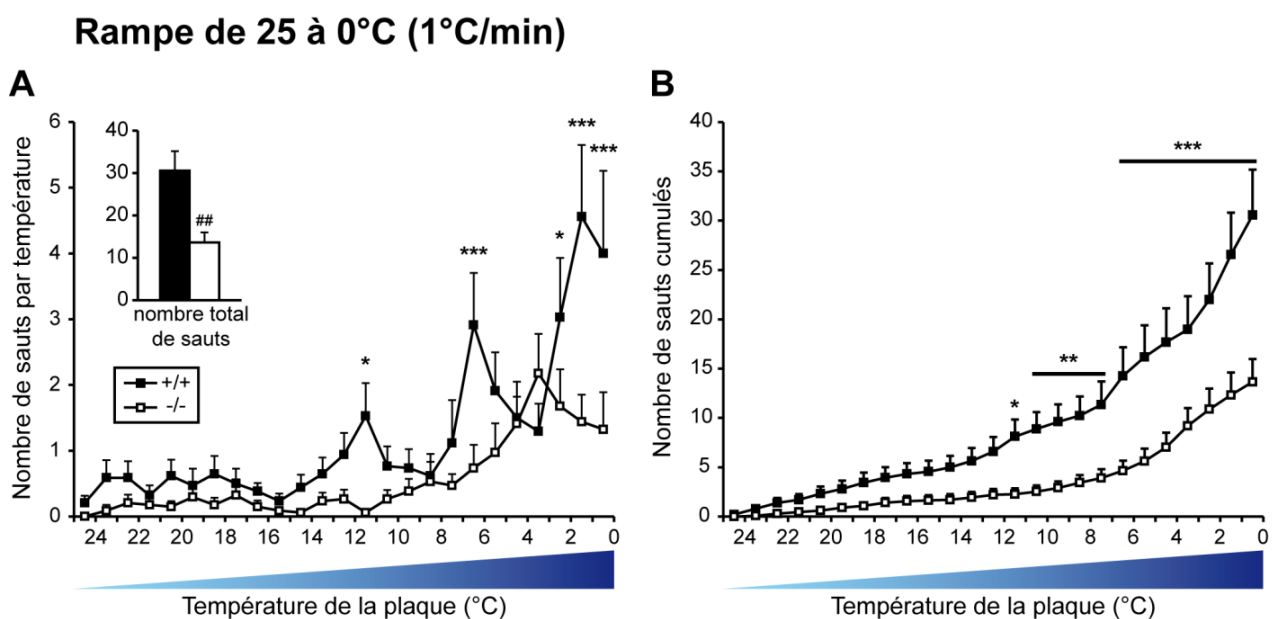


Figure 41. Détermination du seuil de nociception des souris KO Nav1.9 par le test de la rampe froide.

Des souris WT et KO Nav1.9 sont déposées sur une plaque dont la température diminue linéairement de 25 à 0°C à raison de 1°C/min. Le nombre de sauts produits est comptabilisé par tranche de 1°C (soit 1 min). (A) Valeurs brutes. L'encart montre le nombre total de sauts pendant les 25 min de test. (B) Valeurs cumulées. Pour chaque température est représenté le nombre de sauts effectués par l'animal depuis le début du test. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ vs '-/-', two way ANOVA + Student-Newman-Keuls, ## $p < 0,01$ vs '+/+', Mann & Whitney rank sum test, $n = 34$

Ce résultat est surprenant puisque Fumimasa Amaya et al. (2006) ont publié un test de sensibilité au froid chez des souris KO Nav1.9 ne montrant aucune différence avec les animaux WT. Nous avons reproduit ce test qui consiste à déposer les animaux sur une plaque à 0°C pendant 30 s et

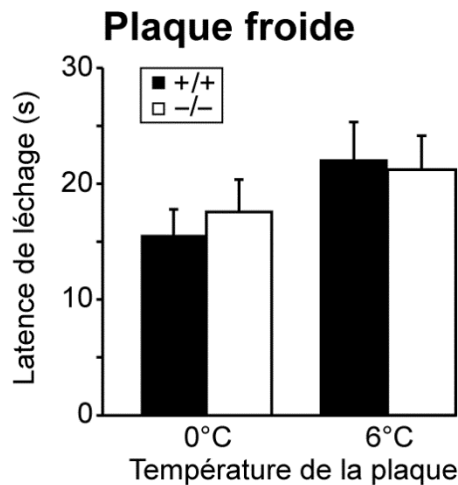


Figure 42. Réponse des souris KO Nav1.9 au test de la plaque froide à 0 et 6°C.

Des souris WT et KO Nav1.9 sont déposées sur une plaque à 0 ou 6°C et la latence de léchage des pattes avant est mesurée. Le cut-off est défini à 30 s (0°C) ou 60 s (6°C). Les animaux montrant un comportement de "freezing" (prostration) sont éliminés. T-test, n=8 (0°C) et n=10 (6°C)

à mesurer la latence de réponse des animaux au froid (en l'occurrence, le léchage des pattes avant qui est le seul comportement que nous avons observé au cours de ce test). Nous avons réalisé cette expérience à 0°C ainsi qu'à 6°C, temps pour lesquels des différences significatives ont été observées au test de la rampe froide. Comme dans l'étude citée ci-dessus, aucune différence n'a été observée entre les deux génotypes, et ce quelle que soit la température testée. Ce test ne semble donc pas permettre de discriminer la sensibilité au froid nociceptif des animaux WT et KO Nav1.9, et il est normal que l'étude Fumimasa Amaya et al. (2006) n'ait pas mis en avant de différence en termes de sensibilité au froid. Une explication possible serait que la réaction comportementale observée serait liée à la perception non-nociceptive du froid et non à de la douleur (voir Discussion).

Nous avons ensuite soulevé le problème des mécanismes compensatoires pouvant avoir lieu chez les souches de souris transgéniques. Pour vérifier que le phénomène observé n'est pas imputable à une modification de l'expression d'un (ou plusieurs) autre gène impliqué dans la sensibilité au froid, nous avons réalisé deux expériences. La première a consisté à quantifier chez les souris KO Nav1.9 l'expression des canaux TRPM8, TRPA1, Nav1.8, TREK-1 et TRAAK, connus pour leur rôle dans la perception du froid (voir chapitre I.1 p. 111). Aucune modification de la transcription de ces gènes n'a pu être mise en évidence (voir Figure 43). Ceci avait déjà été montré pour le canal Nav1.8 (ainsi que pour toutes les autres sous-unités Nav présentes dans les DRG) chez une autre souche de souris Nav1.9^{-/-} par Birgit Priest et al. (2005).

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine

Résultats

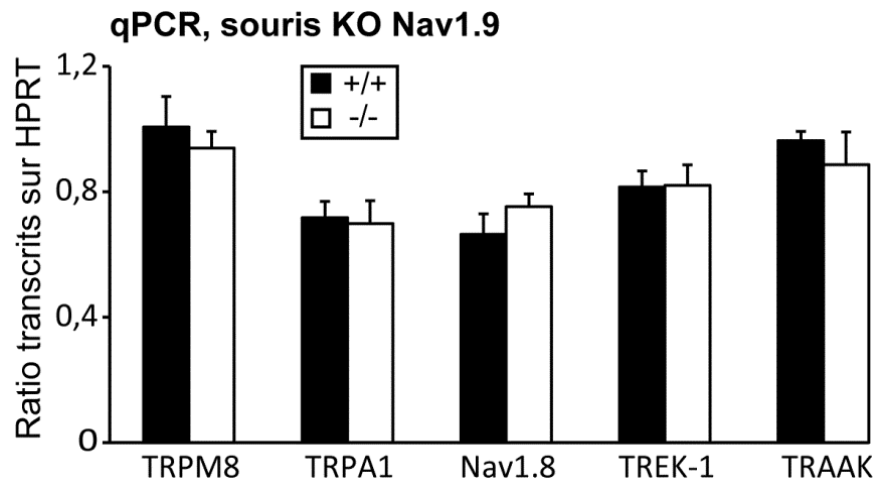


Figure 43. Analyse chez les souris KO Nav1.9 de la transcription de gènes impliqués dans la perception du froid.

La transcription des gènes TRPM8, TRPA1, Nav1.8, TREK-1 et TRAAK, impliqués d'après la bibliographie dans la perception du froid, est analysée par qPCR chez des souris WT et KO Nav1.9. T-test, n=8

Immersion de la patte à 5°C

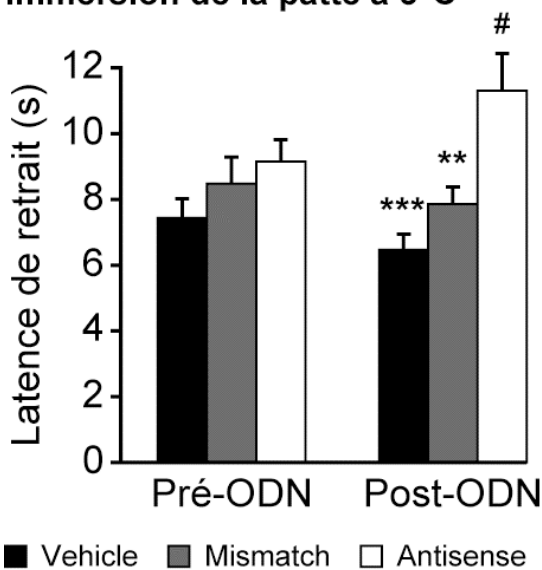


Figure 44. Effet du knock-down Nav1.9 sur la sensibilité au froid douloureux chez le rat.

Des rats ont été soumis au test d'immersion de la patte à 5°C avant et après knock-down Nav1.9, consistant en 2 injections intrathécales par jour pendant 3 jours d'ODN antisens (12,5 µg). Deux groupes contrôle reçoivent les ODN mismatch ou le véhicule. Cut-off=30 s. ***p<0,01 **p<0,001 vs 'Antisens', #p<0,05 vs 'Pré-ODN', two way ANOVA + Student-Newman-Keuls, n=8

Comme il n'est pas exclu que d'autres gènes puissent être dérégulés chez les animaux KO Nav1.9, nous avons testé l'impact d'un traitement antisens chez le rat (selon le même protocole qu'utilisé dans la première partie de la thèse). Les animaux ont été soumis au test d'immersion de la patte dans une eau à 5°C, avant et après 3 jours de traitements antisens (voir Figure 44). Les injections de véhicule ou de mismatch n'ont eu aucun effet sur les seuils de douleur des animaux, mais on voit une augmentation de la latence de retrait de la patte dans le groupe de rats ayant reçu les ODN dirigés contre le transcrite Nav1.9.

Tous ces résultats montrent de façon claire la contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif, et suggèrent que cette implication est directe plutôt que liée à des mécanismes compensatoires.

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine

Résultats

Nous avons réalisé une dernière expérience consistant à activer pharmacologiquement, et non par le froid, les FAP exprimant les canaux TRPM8 ou TRPA1, ceci dans le but de savoir si le rôle du canal Nav1.9 dans la sensibilité au froid passe par une modification de l'excitabilité de ces fibres, indépendamment de la température. Pour se faire, nous avons injecté par voie intraplantaire un agoniste TRPM8 (iciline 14 mM) ou TRPA1 (cinnamaldéhyde 14 mM) à des souris sauvages et KO Nav1.9, et avons quantifié la réponse comportementale des animaux, caractérisée par le léchage de la patte (voir Figure 45). Aucune différence n'a pu être observée entre les deux génotypes et pour les deux agonistes utilisés. Nous avons réalisé un test d'immersion de la patte à 5 et 10°C chez ces animaux 15, 30 et 60 min après injection, mais nous n'avons pas observé d'hypersensibilité au froid reproductible, quel que soit le produit utilisé.

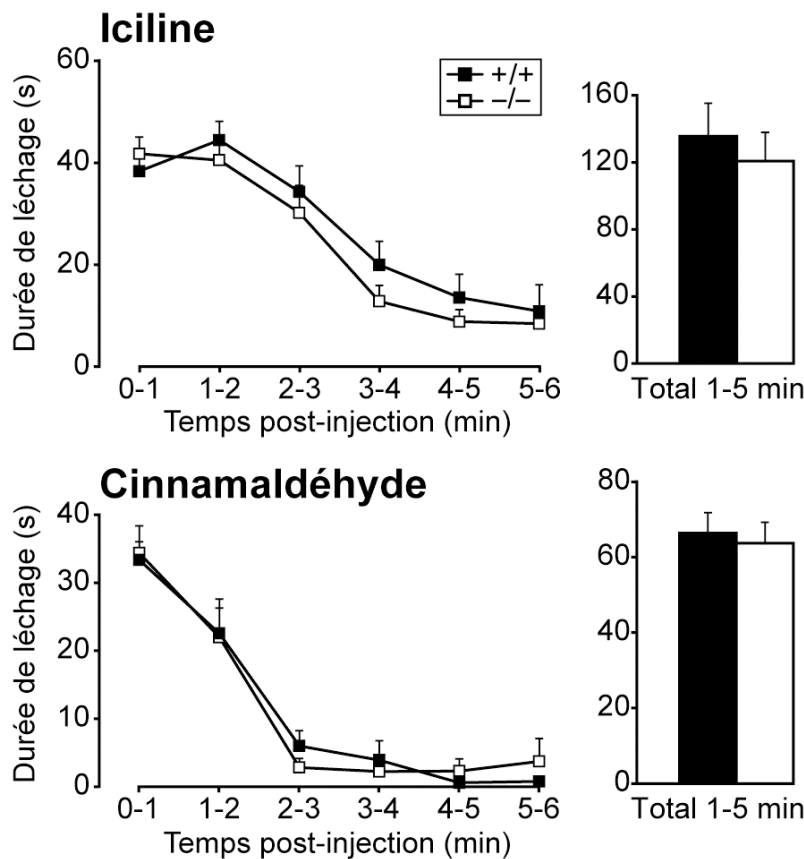


Figure 45. Evaluation de la douleur induite par l'injection d'iciline ou de cinnamaldéhyde chez les souris KO Nav1.9.

Suite à une injection intraplantaire d'iciline (25 μ l, 14 mM) ou de cinnamaldéhyde (25 μ l, 14 mM), le comportement de léchage de la patte produit par des souris sauvages et KO Nav1.9 est quantifié pendant 6 min par tranches de 1 min. Une sommation de la durée de léchage, réalisée sur les 5 premières minutes du test, est donnée par les histogrammes de droite. two way ANOVA (cinétique) et t-test (léchage total), n=10

2. ROLE DU CANAL NAV1.9 DANS L'HYPERSENSIBILITE AU FROID INDUITE PAR L'OXALIPLATINE

L'objectif suivant consiste à déterminer si le canal Nav1.9, en tant qu'acteur de la sensibilité au froid nociceptif, représente un intérêt potentiel pour le traitement de l'hypersensibilité pathologique au froid. Nous avons choisi un modèle dont le symptôme le plus représentatif est l'hypersensibilité au froid, le modèle de neurotoxicité aiguë induite par l'oxaliplatine (voir chapitre I.2 p. 122). Ce modèle a été mis au point au sein de notre laboratoire par Bing Ling et al. (2007b) chez le rat, puis chez la souris par Juliette Descoeur et al. (2011). Il consiste en une injection unique d'oxaliplatine à la dose de 6 mg/kg chez le rat comme chez la souris. Chez le rat, une allodynie mécanique (observée avec le test de von Frey, mais pas avec le test de pression de la patte) et une allodynie au froid (10°C) apparaissent dès 24 à 48 h et perdurent jusqu'à 8 jours. Chez la souris on observe également une allodynie mécanique (test de von Frey) ainsi qu'une allodynie et une hyperalgie au froid (10 et 21°C, respectivement)²⁸. La durée des symptômes est cependant réduite par rapport au rat, avec un maximum d'intensité à 4 jours post-injection et une disparition de l'allodynie au froid au 6^{ème} jour.

Nous avons soumis des souris WT et KO Nav1.9 à ce même traitement et les avons soumis au test d'immersion de la queue à 5, 10, 15 et 20°C, ceci dans le but de quantifier de manière précise l'hypersensibilité au froid développée par les souris WT ainsi que la contribution du canal Nav1.9 à ce phénomène (voir Figure 46).

²⁸ 10°C est une température intermédiaire qui a pu être considérée comme douloureuse ou non selon les études. Ceci explique que la première étude définisse l'hypersensibilité à 10°C comme une allodynie (Ling et al., 2007b), et la seconde comme une hyperalgie (Descoeur et al., 2011). Nous-mêmes observons dans la Figure 40 que le seuil de douleur des souris WT commence pour la première fois à diminuer (légèrement) par rapport au cut-off à partir de 10°C.

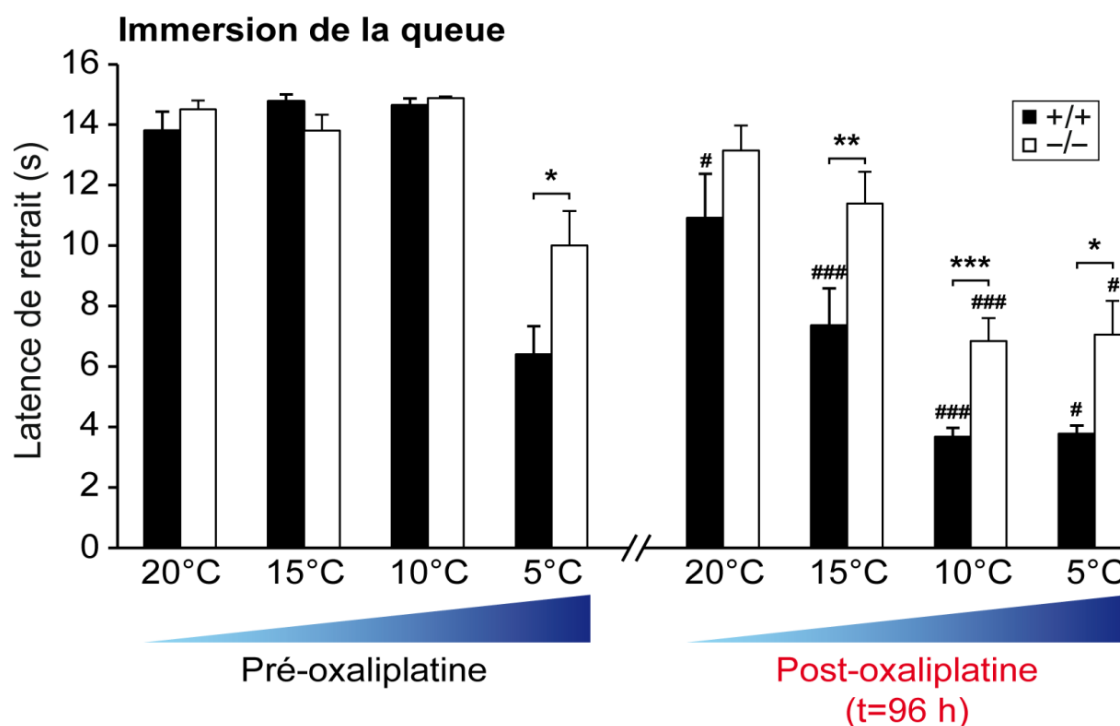


Figure 46. Impact du KO Nav1.9 sur l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine.

Des souris WT et KO ont été soumises au test d'immersion de la queue à 20, 15, 10 et 5°C avant et 96 h après injection intrapéritonéale d'oxaliplatine (6 mg/kg). Cut-off=15 s. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 vs '+/+', #p<0,05 ###p<0,001 vs 'Pré-oxaliplatine', two way ANOVA + Student-Newman-Keuls, n=8

Avant injection d'oxaliplatine, les souris ne produisent pas de réflexe nociceptif aux températures de 20, 15 et 10°C, la latence moyenne de retrait de la queue étant proche du cut-off, défini à 15 s. A 5°C, ce réflexe est observable et l'on retrouve le déficit de sensibilité chez les souris KO observé précédemment. 96 h après injection d'oxaliplatine, une hypersensibilité au froid est observable chez les souris sauvages, significative pour toutes les températures de 20 à 5°C. Chez les souris KO, ce symptôme n'est détectable qu'à partir de 10°C, et les seuils de douleur restent significativement plus élevés pour toutes les températures inférieures à 15°C. Cette expérience montre que la délétion du gène codant la sous-unité Nav1.9 permet non seulement de repousser la température d'apparition de l'hypersensibilité de 20 à 10°C, mais également de réduire l'intensité de cette dernière.

Le test d'immersion de la patte est un test de sensibilité périphérique, caractérisé par un réflexe spinal. Nous avons donc réalisé ensuite un test de préférence thermique impliquant les composantes cognitivo-émotionnelles de la douleur, donnant la liberté aux souris de se déplacer entre deux plaques, l'une à 25°C, l'autre étant fixée à 21 ou 12°C. Pour le couple 25/21°C (voir Figure 47A) nous ne mettons pas en évidence de diminution significative du temps passé sur la plaque à 21°C, quel que soit le génotype. Pour le couple 25/12°C, nous observons un fort évitement de la plaque la plus froide chez

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine

Résultats

les souris WT puisqu'elles ne restent sur cette plaque que $21,0 \pm 2,8$ s sur les 180 s d'expérience. Cette préférence est significativement réduite chez les souris KO Nav1.9 ($31,8 \pm 3,8$ s sur la plaque froide). Après injection d'oxaliplatine, on observe une hypersensibilité caractérisée par une augmentation de la préférence des animaux pour la plaque à 25°C , sans différence entre les deux génotypes. La raison pour laquelle aucune différence n'est visible entre les souris WT et KO Nav1.9 est certainement que le maximum d'évitement de la plaque froide est atteint (WT : $13,2 \pm 2,0$ s ; KO : $13,0 \pm 2,3$ s sur la plaque à 12°C). En effet, les animaux doivent explorer un minimum cette plaque pour pouvoir la considérer comme douloureuse ou inconfortable. Ce constat est appuyé par le fait que lorsque l'on utilise un couple de températures avec un différentiel encore plus grand, soit $25/5^{\circ}\text{C}$, les souris WT ne descendent pas en dessous de $11,4 \pm 2,3$ s passées sur la plaque à 5°C . La réduction du différentiel thermique par abaissement de la température de référence (couple $15/5^{\circ}\text{C}$) ne permet pas d'augmenter le temps passé sur la plaque à 5°C de manière significative ($11,9 \pm 1,1$ s sur la plaque à 5°C). Ceci constitue une limite importante de ce test.

Préférence thermique

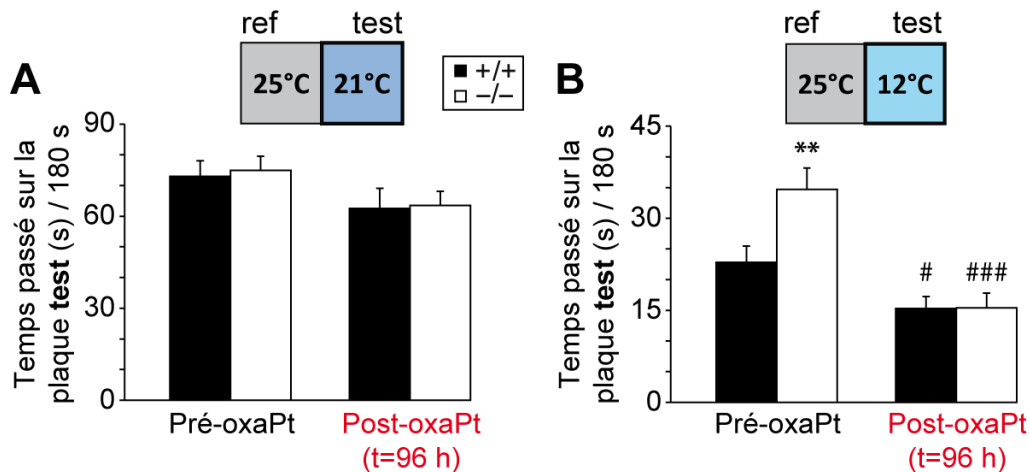


Figure 47. Effet de l'oxaliplatine sur la préférence thermique chez la souris KO NAV1.9.

Des souris WT et KO Nav1.9 ont été soumises au test de préférence thermique pendant 180 s. Le temps passé sur la plaque de référence, maintenue à 25°C , ainsi que sur la plaque test à 21°C (A) ou 12°C (B), est comptabilisé. 96 h après une injection intrapéritonéale d'oxaliplatine (oxaPt, 6 mg/kg) les animaux sont à nouveau soumis au test. Les valeurs représentées correspondent au temps passé sur la plaque test et sont issues de la moyenne de deux passages. Les animaux n'ayant pas changé de plaque pendant l'expérience sont éliminés. ** $p < 0,01$ vs '+/+', # $p < 0,05$ ### $p < 0,01$ vs 'Pré-oxaPt', two way ANOVA + Student-Newman-Keuls, $n=26$

Un autre test classiquement utilisé pour caractériser l'existence d'une allodynie au froid est le test à l'acétone qui consiste à appliquer une goutte d'acétone sous la patte de l'animal. L'évaporation rapide du solvant va provoquer un refroidissement léger de la peau, non douloureux chez des animaux sains alors que des animaux allodyniques vont manifester un comportement nociceptif caractérisé par le léchage de la patte. Suite à l'application sous-plantaire d'acétone et après injection d'oxaliplatine, nous observons cette hypersensibilité chez les souris WT alors qu'elle est totalement absente chez les souris KO Nav1.9 (voir Figure 48). Ce résultat va dans le sens des données acquises en immersion de la queue, montrant que le canal Nav1.9 est indispensable à l'apparition d'une allodynie au froid suite à un traitement aigu à l'oxaliplatine.

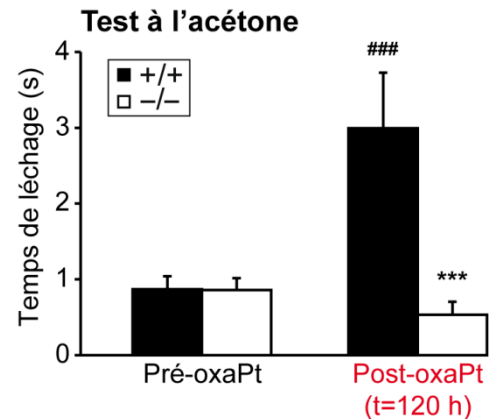


Figure 48. Evaluation de l'allodynie au froid induite par l'oxaliplatine chez les souris KO Nav1.9.

Des souris WT et KO Nav1.9 ont été soumises au test à l'acétone avant et 120 h après injection intrapéritonéale d'oxaliplatine (oxaPt, 6 mg/kg). *** $p < 0,001$ vs '+/+', ### $p < 0,001$ vs 'Pré-oxaPt', two way ANOVA + Student-Newman-Keuls, $n=8$

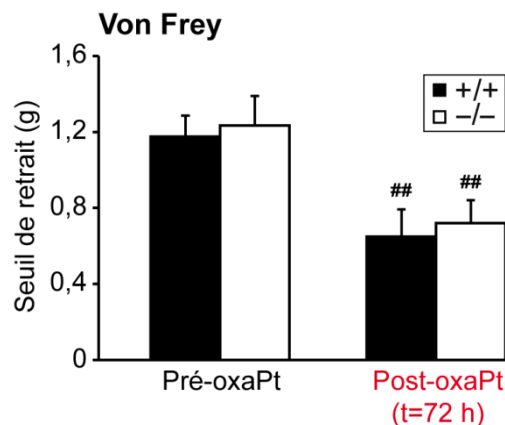


Figure 49. Evaluation de l'hypersensibilité mécanique induite par l'oxaliplatine chez les souris KO Nav1.9.

Des souris WT et KO Nav1.9 ont été soumises au test de von Frey avant et 72 h après injection intrapéritonéale d'oxaliplatine (oxaPt, 6 mg/kg). Les seuils présentés sont issus des moyennes des valeurs obtenues sur les pattes arrière gauches et droites des animaux. Cut-off=2 g. ## $p < 0,01$ vs 'Pré-oxaPt', two way ANOVA + Student-Newman-Keuls, $n=8$

L'implication du canal Nav1.9 dans l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine dépasse donc la gamme de température dans laquelle il est impliqué chez les animaux sains. Ceci semble montrer que dans ce cas pathologique, le canal est soumis à une régulation l'impliquant dans d'autres modalités de stimulation que le simple froid intense. Nous avons alors voulu déterminer si le canal Nav1.9 pouvait dans ce contexte contribuer à l'hypersensibilité mécanique. 72 h après injection d'oxaliplatine, les souris WT comme les souris KO développent une hypersensibilité aux stimulations mécaniques de manière similaire (test de von Frey, voir Figure 49). L'implication du canal Nav1.9 dans l'hypersensibilité induite par l'oxaliplatine se limiterait donc à la modalité froide.

Comme dans la première partie de cette thèse, nous avons cherché à savoir si le knock-down de Nav1.9 par injections d'ODN antisens pouvait améliorer le symptôme d'hypersensibilité au froid induit par l'oxaliplatine chez le rat. Nous avons donc réalisé l'injection d'oxaliplatine en même temps que la

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine

Résultats

première injection d'ODN puis avons évalué la sensibilité au froid des animaux, après trois jours de traitement antisens, par immersion de la patte à 15 et 5°C (voir Figure 50). Alors que l'hypersensibilité thermique est retrouvée chez les rats traités par injections d'ODN mismatch ou de véhicule à 15°C comme à 5°C, le traitement antisens a permis d'abolir totalement ce symptôme, et ce quelle que soit la température.

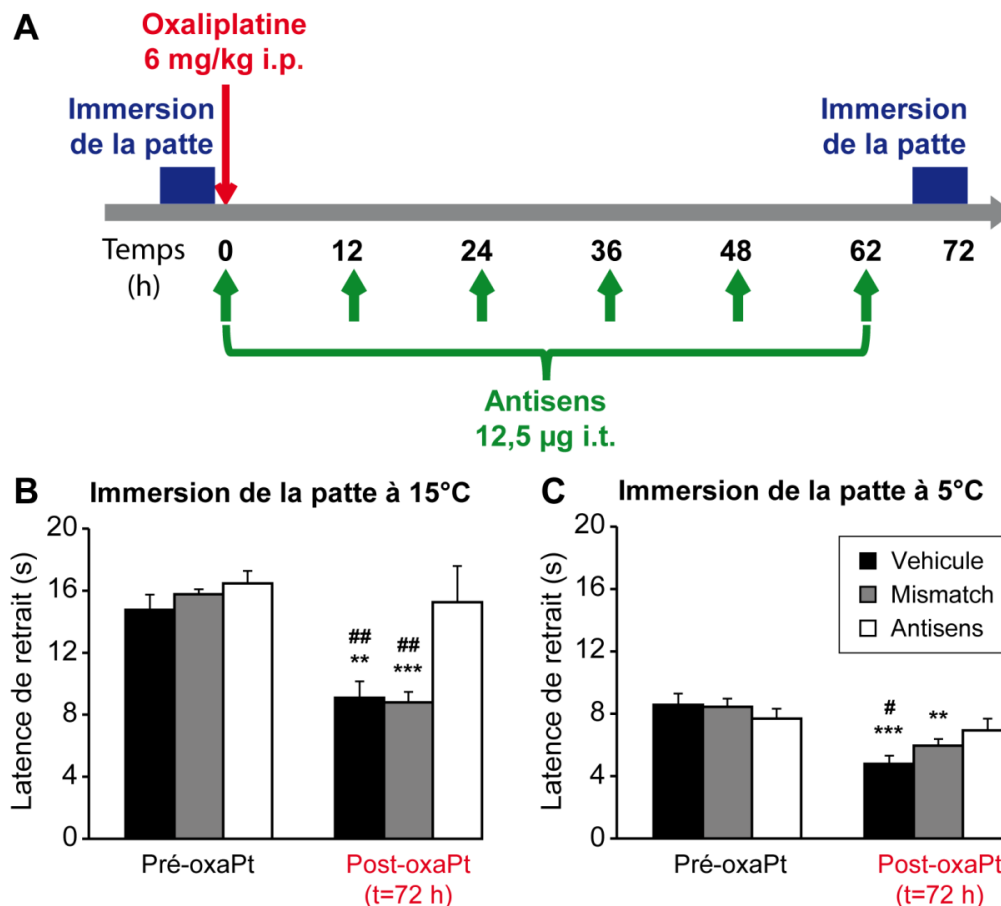


Figure 50. Impact du knock-down de Nav1.9 sur l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine.

(A) Design de l'expérience. Des rats ont été soumis au test d'immersion de la patte à 15°C (B) et 5°C (C) avant injection intrapéritonéale d'oxaliplatine (oxaPt, 6 mg/kg) et knock-down de Nav1.9 par 6 injections intrathécales d'antisens (12,5 µg) espacées chacune de 12 h. 72 h après l'injection d'oxaliplatine, les seuils d'immersion de la patte sont à nouveau réalisés. Cut-off=30 s. **p<0,01 ***p<0,001 vs 'Véhicule', #p<0,05 ##p<0,01 vs "Pré-oxaPt", two way ANOVA + Student-Newman-Keuls, n=8

Enfin, les DRG de rats ayant reçu une injection d'oxaliplatine ont été prélevés à différents temps pour analyse de l'expression du canal Nav1.9 par qPCR. Aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les animaux ayant reçu l'oxaliplatine ou le véhicule seul, à 22 h, 70 h (le temps retenu pour les tests comportementaux), 90 h et 120 h (données non présentées).

IV. DISCUSSION & PERSPECTIVES

Au cours de cette deuxième partie du travail de thèse, nous montrons l'implication du canal Nav1.9 dans la perception du froid nociceptif. Différents tests ont été réalisés chez la souris KO Nav1.9 pour confirmer cette observation et clarifier le rôle de ce canal dans la sensibilité au froid. Il apparaît que Nav1.9 contribue très fortement à la sensibilité au froid $\leq 5^{\circ}\text{C}$, avec un rôle perceptible dès 12°C selon le test considéré. La délétion du gène codant cette sous-unité chez la souris provoque un décalage du seuil de nociception vers des températures plus négatives, ainsi qu'une diminution de l'intensité de la réaction comportementale observée. L'analyse transcriptionnelle des autres senseurs moléculaires du froid connus, ainsi qu'une expérience de knock-down chez le rat, suggèrent que le phénotype observé chez les souris KO est directement imputable à l'absence de canaux Nav1.9 fonctionnels, et non dépendante d'éventuels mécanismes compensatoires. Dans un deuxième temps, nous avons montré que la délétion du gène codant Nav1.9 permet de réduire l'hyperalgie au froid induite par l'oxaliplatine ($\leq 5^{\circ}\text{C}$) et de supprimer complètement l'allodynie ($>10^{\circ}\text{C}$). Il n'y a par contre aucun effet sur l'hypersensibilité mécanique, ce qui implique le canal Nav1.9 dans l'hypersensibilité au froid de manière spécifique. Nous confirmons ces résultats chez le rat traité par antisens, et n'observons pas chez ce dernier modèle de surexpression du canal Nav1.9 suite à une injection d'oxaliplatine.

1. CONTRIBUTION DU CANAL NAV1.9 A LA PERCEPTION DU FROID INTENSE

1.1. Observations comportementales

Nous montrons pour la première fois que le canal Nav1.9 est un acteur important de la sensibilité nociceptive au froid. Le test d'immersion de la patte réalisé montre une forte implication du canal dans la perception du froid à 0 et 5°C ainsi qu'une différence notable mais non significative entre les souris WT et KO Nav1.9 à la température de 10°C . Le cut-off de 15 s défini pour ce test peut cependant représenter un facteur limitant pour la mise en évidence de différences entre les génotypes à une température pour laquelle les souris sauvages présentent déjà une réponse proche

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine

de 15 s ($12,75 \pm 0,90$ s contre $14,88 \pm 0,12$ s pour les souris KO). Nous avons donc réalisé un second test permettant de définir le seuil de nociception de ces animaux en éliminant ce biais. Le test de la rampe froide (de 25 à 0°C en 25 min) nous permet de mettre en évidence une hyposensibilité significative chez les souris KO Nav1.9 dès 11 à 12°C, caractérisée par un nombre de saut en réponse au froid diminué. Par ce test, nous mettons en évidence non seulement un décalage du seuil de nociception des souris KO vers des températures plus froides (1^{er} pic de sauts à 11-12°C chez les souris WT et 3-4°C chez les souris KO) mais aussi une diminution de l'intensité de la réaction des animaux ($4,6 \pm 1,1$ sauts maximum chez les WT, $2,2 \pm 0,6$ sauts chez les KO). L'existence d'un défaut de sensibilité au froid dès 12°C est confirmée par le test de préférence thermique. En effet, lorsqu'on leur laisse la liberté d'explorer librement deux plaques à 25 et 12°C, les souris KO Nav1.9 montrent un évitement moins marqué de la plaque la plus froide que ce qui est observé chez les souris sauvages.

L'implication du canal Nav1.9 dans la perception du froid nociceptif est donc très claire mais aussi surprenante puisque l'étude publiée par Fumimasa Amaya et al. en 2006 n'a mis en évidence aucune différence en termes de sensibilité au froid entre les souris WT et KO Nav1.9. Les auteurs ont utilisé le test de la plaque froide à 0°C. Nous avons reproduit ce test (à 0 et 6°C) et avons réalisé le même constat. Il semble que le test de la plaque froide, basé sur la latence d'apparition de la première réaction comportementale pouvant être attribuée à la perception du froid (caractérisée par un tremblement dans l'étude de Fumimasa Amaya et al., et par le léchage des pattes avant dans le présent travail), ne permette pas de mettre en évidence l'hyposensibilité observée chez les souris KO Nav1.9. De la même manière, une étude réalisée chez des souris KO TRPA1 (Karashima et al., 2009) soumises au test de la plaque froide à 0°C n'a permis de mettre en évidence aucune différence dans la latence de tremblement ou de léchage des pattes (les deux réactions étant prises en compte). Cependant, en laissant les animaux sur la même plaque pendant 2 min et en observant la latence et le nombre de sauts réalisés, les auteurs mettent en évidence une très forte hyposensibilité chez les souris KO TRPA1. Au vu de ces observations et de nos résultats, nous suggérons que le léchage des pattes ou les tremblements constituent des réponses de nature non nociceptives au froid, traduisant le caractère uniquement sensori-discriminatif de la perception thermique, alors que les sauts (que nous avons observé lors du test de la rampe froide) seraient caractéristiques du caractère nociceptif de la stimulation, et nécessiteraient un temps passé sur la plaque froide plus long. Ceci permettrait d'expliquer les résultats négatifs obtenus avec le test de la plaque froide et le fait que la contribution du canal Nav1.9 dans la sensibilité au froid soit passée inaperçue. Les animaux chez lesquels la fonction du canal Nav1.9 est inhibée (par génie génétique ou stratégie antisens) conserveraient donc leur capacité à discriminer la température, même intensément froide, alors que la perception nociceptive de ce froid est diminuée.

1.2. Mécanisme d'implication

Nous avons tout d'abord quantifié chez les souris KO Nav1.9, comparativement aux souris sauvages, l'expression des gènes TRPM8, TRPA1, Nav1.8, TREK-1 et TRAAK connus pour leur rôle dans la sensibilité au froid, douloureuse ou non. Cette analyse *a priori* n'a montré aucune différence de l'expression de ces gènes entre les deux génotypes. Cependant, toutes les protéines impliquées dans la perception du froid ne sont pas connues et une étude plus complète du transcriptome des souris KO Nav1.9, par exemple par microarray, pourrait peut-être permettre la découverte de gènes dont l'expression est modifiée chez ces animaux et ayant potentiellement un rôle dans la perception nociceptive du froid. Nous avons réalisé un deuxième test dans le but de contourner les phénomènes compensatoires pouvant éventuellement exister chez les souris KO Nav1.9, consistant à un knock-down de Nav1.9 par traitement antisens de 3 jours chez le rat. Nous observons le même phénotype que chez les souris KO (hyposensibilité marquée au test d'immersion de la patte à 5°C), rendant peu probable le rôle d'une perturbation de l'expression d'un ou plusieurs autres gènes, même si nous ne pouvons pas l'exclure totalement. Un traitement pharmacologique des animaux par la drosotoxine²⁹ pourrait permettre de répondre de manière définitive à cette question. En effet, si l'effet de cette toxine sur la sensibilité au froid est immédiat (de l'ordre de quelques minutes), nous pourrions alors exclure tout phénomène compensatoire sur l'expression d'autres gènes. Si en revanche cette toxine, dont l'action sur l'hypersensibilité douloureuse inflammatoire est très rapide (Gaudio-Tyzra et al., soumis à publication) nécessite un temps de traitement de l'ordre du traitement antisens que nous avons réalisé, alors la modification de l'expression d'un autre gène lui-même senseur du froid devra être recherchée activement.

Si le canal Nav1.9 est lui-même un acteur de la sensibilité douloureuse au froid, son absence doit être suffisante pour diminuer l'excitabilité des fibres sensibles au froid, ou au moins d'une partie d'entre elles. Nous avons pour cela engagé un travail en collaboration avec l'équipe dirigée par Patrick Delmas au sein de l'UMR CNRS 6231. Des neurones de DRG mis en culture sont soumis à une rampe de température décroissante allant de 33 à 16°C en 110 s et leur activation est visualisée en temps réel par imagerie calcique. Les premiers résultats, obtenus très récemment, montrent une diminution de l'activation des neurones provenant d'animaux Nav1.9^{-/-} en réponse au froid, en termes de nombre de cellules répondant à la rampe froide mais aussi par l'intensité de la réponse enregistrée au sein de la population de cellules activées (voir Figure 48). Dans ces cellules répondantes, la température nécessaire pour déclencher l'activation neuronale ($\approx 20^\circ\text{C}$), ainsi que la température à laquelle le pic d'activation est enregistré ($\approx 17^\circ\text{C}$), ne diffèrent cependant pas entre les souches WT et KO Nav1.9

²⁹ Peptide permettant une modulation négative spécifique du courant Nav1.9 (voir discussion partie I, p. 93).

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine

(données non présentées). Or, nous avons montré par le test de la rampe froide que si le canal Nav1.9 était impliqué dans l'intensité de la réponse au froid *in vivo*, il contribuait aussi à la définition du seuil de nociception. L'absence de réponse des souris KO aux températures de 11-12°C (premier pic de douleur chez les souris WT) pourrait être due à un défaut d'excitabilité d'une population de fibres pour lesquelles la présence du canal Nav1.9 est indispensable, représentée par le pourcentage de fibres non activées par la rampe froide chez les souris KO dans la Figure 48. Dans une seconde population de fibres à plus haut seuil d'activation (*i.e.* activées par des températures plus basses), le canal Nav1.9 permettrait d'amplifier la réponse sans modification du seuil d'activation. Ceci serait à l'origine de la diminution de l'intensité de la douleur observée chez les souris KO à très basse température (7°C et en dessous). Il est également surprenant que la différence de réponse au froid observée entre les neurones issus d'animaux sauvages et KO Nav1.9 puisse être visible alors que la rampe thermique ne descend pas sous la barre des 16°C (en comportement, nous n'observons pas de différence entre les génotypes au-dessus de 12°C). Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'*in vivo*, lorsque l'on applique une stimulation froide au niveau cutané, le refroidissement effectif de la peau soit limité par l'inertie thermique du tissu, la chaleur produite localement et par l'afflux sanguin. La température à appliquer au niveau cutané *in vivo*, nécessaire pour visualiser la contribution du canal Nav1.9 dans la perception du froid, serait donc inférieure à la température d'implication du canal Nav1.9 *in vitro*.

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxalipatine

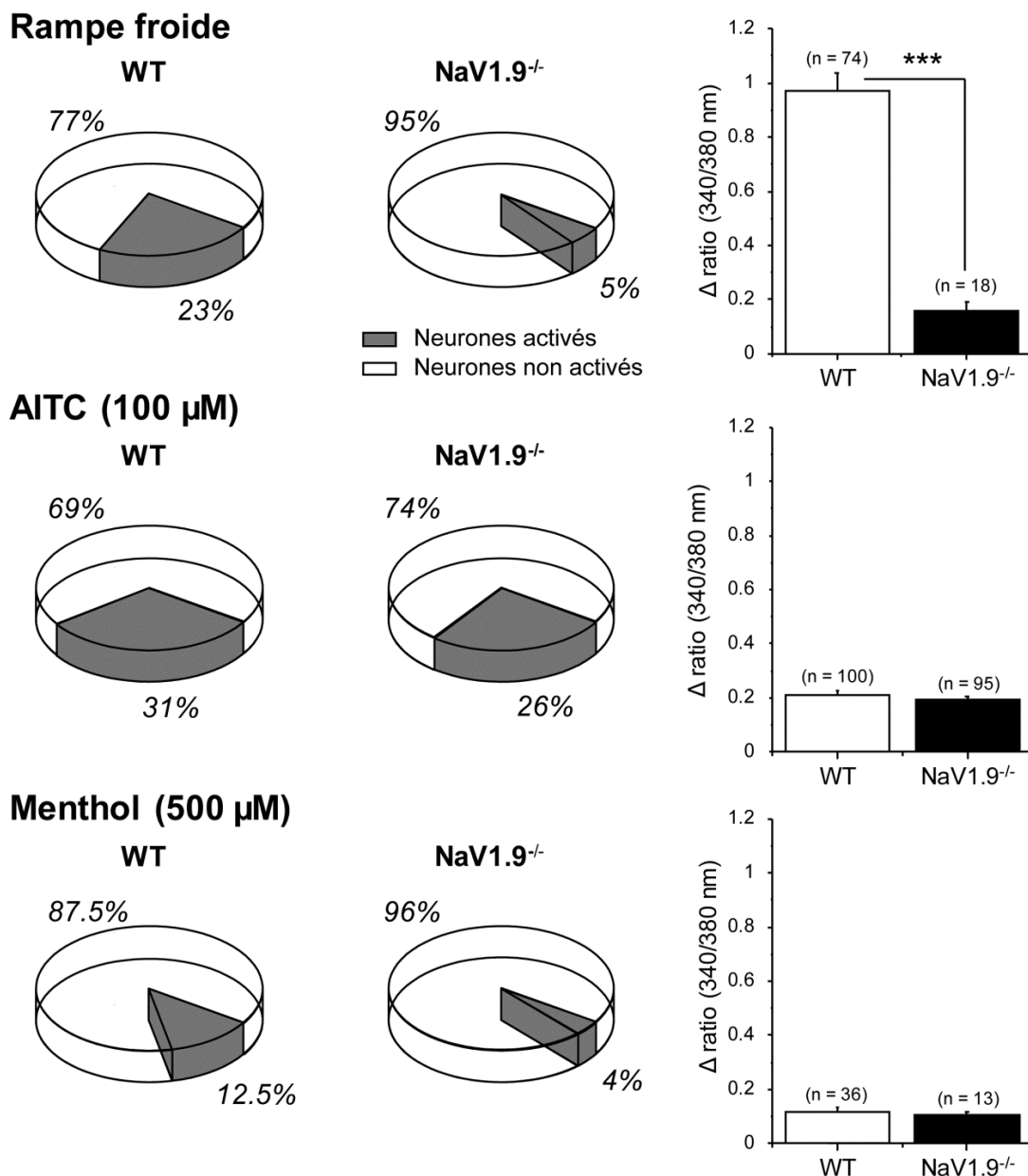


Figure 51. Contribution du canal Nav1.9 à l'activation neuronale en réponse au froid, à l'AITC et au menthol.

Des neurones de DRG de souris WT et KO Nav1.9 ont été mis en culture et soumis à une rampe froide (33 à 16°C en 110 s), un agoniste TRPA1 (AITC 100 µM) ou à un agoniste TRPM8 (menthol 500 µM). L'activation neuronale est suivie par imagerie calcique (sonde Fura PE 3M). Les camemberts représentent le pourcentage de cellules activées (gris) ou non (blanc) au sein des populations Nav1.9^{+/+} et Nav1.9^{-/-}. Les histogrammes représentent l'intensité moyenne d'activation (différence des ratios 340/380 nm entre l'état de repos et le pic de la réponse) enregistrée au sein de la population de cellules répondantes. Le nombre de neurones pris en compte pour ce calcul est indiqué au-dessus des barres d'histogramme. *** p<0,001, Mann & Whitney rank sum test. Expérience conduite par le Dr Lise Rodat-Despoix à l'UMR CNRS 6231.

L'activation neuronale déclenchée par un agoniste TRPM8 (menthol) ou TRPA1 (AITC) induit une réponse calcique équivalente entre les neurones de DRG Nav1.9^{+/+} et Nav1.9^{-/-} (voir Figure 51). Le nombre de cellules activées diminue au sein de la population KO Nav1.9 suite à l'application de menthol, mais de façon bien moins importante que ce qui est observable suite à l'application d'une rampe froide (le nombre de cellules enregistrées en cependant encore très faible). Les expériences de

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine

pharmacologie sont conduites à température ambiante (21-22°C), ce qui est la limite supérieure d'activation du canal TRPM8 (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002a). Il n'est donc pas exclu qu'une partie des neurones TRPM8-positifs observés soit activée par le froid plutôt que par le menthol (ou par une action synergique des deux facteurs), ce qui pourrait conduire à un mécanisme différent. Les données obtenues *in vivo* suite à l'injection intraplantaire d'antagonistes TRPM8 (iciline) et TRPA1 (cinnamaldéhyde) vont dans le même sens que les données obtenues *in vitro*, puisque la réaction douloureuse observée ne diffère pas entre les souris sauvages et KO Nav1.9. Ces données semblent indiquer que le rôle joué par le canal Nav1.9 dans la perception du froid ne passerait pas par une modulation de l'excitabilité des fibres TRPM8 ou TRPA1-positives (du moins à température ambiante). Un refroidissement est nécessaire pour observer sa contribution à l'activation neuronale. Dans ce contexte il faut alors vérifier que le canal Nav1.9 n'est pas lui-même le senseur du froid.

Dans la continuité de ce raisonnement, un autre travail en cours de réalisation à l'UMR CNRS 6231 consiste à définir si le canal Nav1.9 est lui-même un senseur du froid, ou s'il contribue à l'excitabilité neuronale en réponse au froid de manière indirecte. Ce travail consiste à observer l'impact d'un refroidissement sur les propriétés électrophysiologiques du canal Nav1.9. Les résultats préliminaires montrent que le froid ($\approx 15^\circ\text{C}$) réduit fortement le courant Nav1.9 induit par une dépolarisation de -100 à -55 mV, contrairement à ce qui est observé pour le canal Nav1.8 qui présente une bonne résistance au froid (Zimmermann et al., 2007, et voir Figure 52). L'effet du froid sur les propriétés d'activation et d'inactivation du canal n'est pas encore connu et l'analyse doit être poursuivie. Cela dit, ces données montrent d'ores et déjà que le canal Nav1.9 n'est pas en mesure d'induire une dépolarisation en réponse à un refroidissement et n'est donc pas un senseur direct du froid.

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine

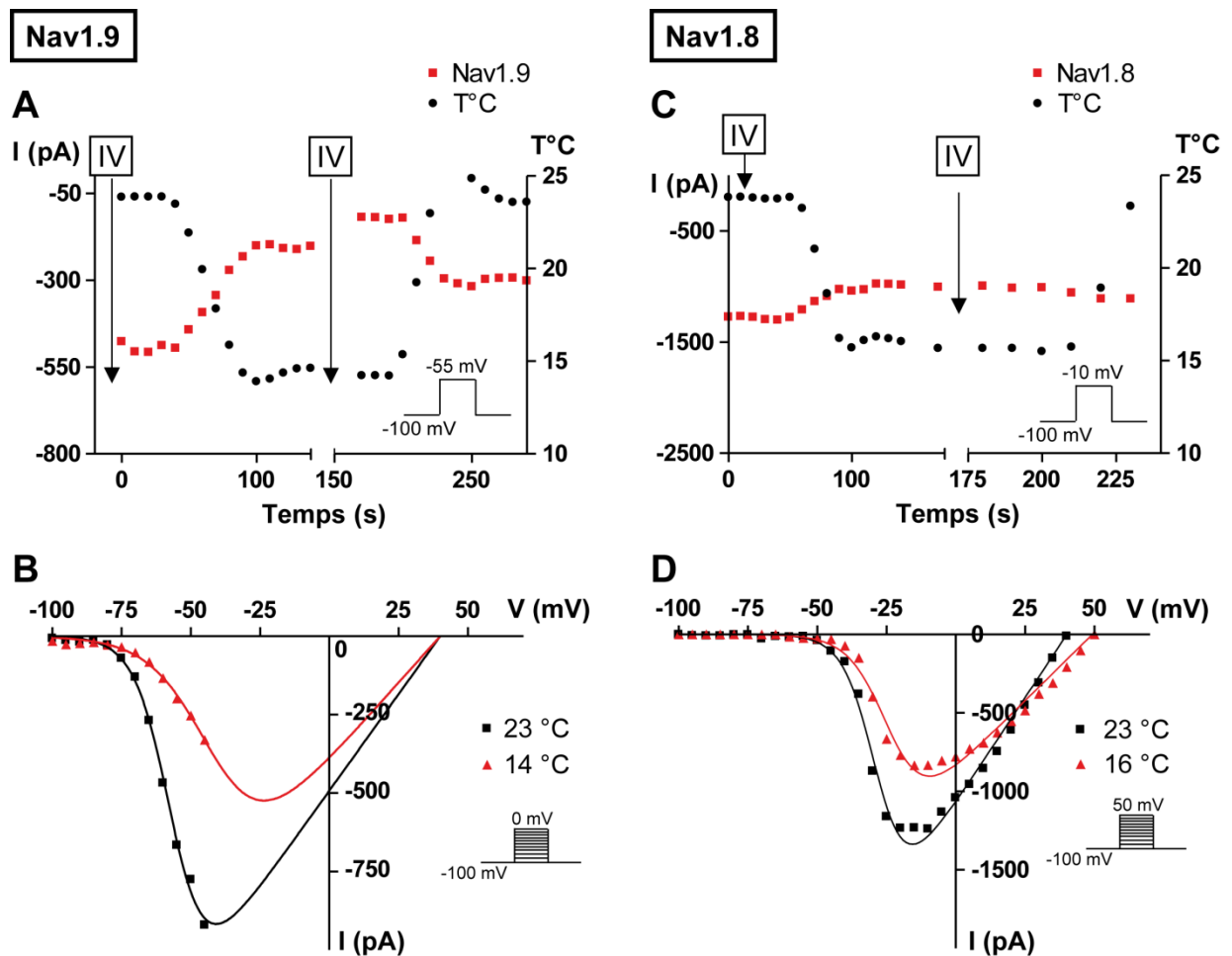


Figure 52. Effet d'un refroidissement sur les propriétés électrophysiologiques des canaux Nav1.8 et Nav1.9.

(A,C) Par patch clamp sur des neurones de DRG en culture, les courants Nav1.9 et Nav1.8 (carrés rouges) sont enregistrés en réponse à des dépolarisations respectives de -55 et -10 mV et la température (ronds noirs) est descendue de $\approx 24^{\circ}\text{C}$ à $\approx 15^{\circ}\text{C}$. Une courbe IV (Intensité/Voltage) est réalisée pour chaque température, au temps marqué par des flèches noires. Celles-ci sont représentées en B (Nav1.9) et en D (Nav1.8) et les protocoles de stimulation sont donnés en insert. Expérience conduite par le Dr Christelle Gaudio-Tyzra à l'UMR CNRS 6231.

1.3. Perspectives

Nos données montrent que le canal Nav1.9 est impliqué dans la nociception ainsi que dans l'activation neuronale déclenchée par le froid. En revanche, il ne semble pas (ou peu) être impliqué dans l'activation neuronale médiée par l'activation des canaux TRPM8 et TRPA1, ni être le senseur direct de la baisse de température. Le mécanisme par lequel le canal Nav1.9 intervient dans l'excitabilité neuronale en réponse au froid reste donc tout à fait obscur.

Pour clarifier ces mécanismes, il serait intéressant dans un premier temps d'observer dans quelle mesure ce canal Nav1.9 est colocalisé avec les canaux TRPM8 et TRPA1, dont les territoires d'expression ne se chevauchent pas et représentent deux populations neuronales distinctes (Story et al., 2003; Kobayashi et al., 2005). Les canaux TRPA1 et Nav1.9 étant tous deux fortement colocalisés

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine

avec le canal TRPV1 (le canal TRPM8 n'étant pas colocalisé avec ce dernier), on peut penser que le canal Nav1.9 pourrait être colocalisé avec le canal TRPA1 (Peier et al., 2002b; Story et al., 2003; Amaya et al., 2006). Des expériences d'hybridation *in situ* sont en cours au laboratoire pour explorer ces coexpressions.

Nous souhaitons aussi évaluer l'impact de la délétion du gène codant Nav1.9 sur l'activation médullaire en réponse au froid, au menthol et à l'AITC. Des expériences d'immunohistochimie sur des sections de moelle épinière d'animaux WT et KO Nav1.9 recevant l'innervation plantaire seront réalisées. Le marquage médullaire c-Fos (marqueur de l'activité neuronale) après stimulation froide au niveau de la patte, ou injection intraplantaire de menthol ou d'AITC, sera quantifié pour visualiser dans quelle mesure le canal Nav1.9 contribue à l'activation médullaire médiée par le froid ou par l'activation des canaux TRPM8 et TRPA1. En plus de confirmer ou non les résultats obtenus en imagerie calcique (implication du canal Nav1.9 dans l'activation neuronale en réponse au froid mais pas à l'activation pharmacologique de TRPM8 ou TRPA1), cette expérience nous permettrait de connaître les territoires médullaires de projection des neurones au sein desquels le canal Nav1.9 contribue à la perception du froid.

L'utilisation de la technique de nerf-peau pourrait aussi se révéler intéressante. Cette technique consiste à enregistrer l'activité électrique de fibres nerveuses isolées tout en stimulant leur champ récepteur sur un fragment de peau dont l'innervation est conservée. L'application de rampes froides sur des préparations de nerf-peau issues de souris sauvages et KO Nav1.9 permettrait de connaître plus précisément le rôle joué par Nav1.9 dans la genèse des PA par les fibres sensibles au froid (seuil d'activation et/ou fréquence de décharge). De plus, il serait possible *a posteriori* de tester leur sensibilité au menthol et à l'AITC pour déterminer si une sous-population particulière de fibres (TRPM8- ou TRPA1-positives) requiert Nav1.9 pour générer une réponse normale au froid.

Nous avons également généré au laboratoire une souche de souris double KO TRPM8^{-/-}-Nav1.9^{-/-} par croisement de notre souche KO Nav1.9 avec la souche KO TRPM8 de David Julius (McKemy et al., 2002). Ceci a pour but, en combinaison avec l'utilisation d'un antagoniste spécifique du canal TRPA1 (le HC-030031), de voir si les rôles respectifs de ces 3 canaux dans la sensibilité au froid peuvent ou non être additifs (voir Figure 53). Concrètement, si par exemple le blocage du canal TRPA1 n'induit pas de diminution de la sensibilité au froid chez les souris KO Nav1.9 alors qu'il a un effet chez les souris KO TRPM8, nous pourrions en conclure que les canaux TRPA1 et Nav1.9 ont un fonctionnement couplé au sein des mêmes neurones, où la disponibilité de chacun est nécessaire. Nous pourrions également mettre en évidence la situation inverse (collaboration fonctionnelle entre TRPM8 et Nav1.9), un rôle du canal Nav1.9 à la fois dans les neurones TRPM8-positifs et TRPA1-positifs, ou encore un rôle aucunement relié à l'un ou l'autre de ces deux canaux TRP.

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxalipatine

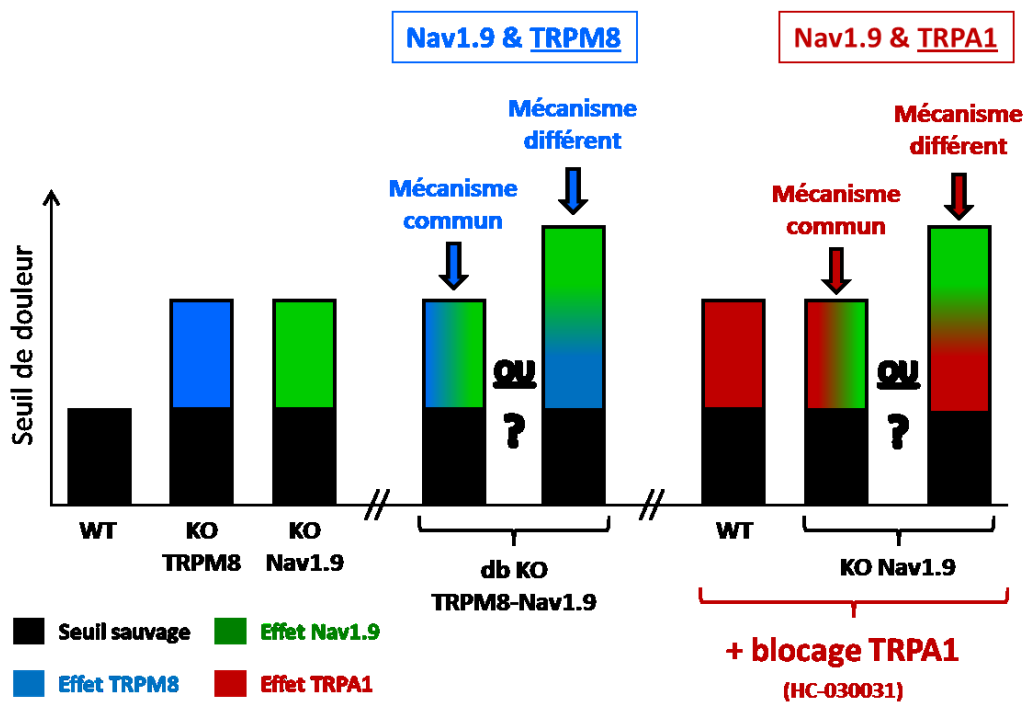


Figure 53. Expérience proposée pour mettre en évidence l'éventuelle convergence des mécanismes impliquant Nav1.9, TRPM8 et TRPA1 dans la perception du froid nociceptif.

Les histogrammes correspondent aux seuils de douleur (déterminés arbitrairement) des animaux, évalués par immersion de la patte à 0 ou 5°C.

Même si l'analyse des expériences de patch clamp doit encore être complétée (propriétés d'activation et d'inactivation), le fait que le courant produit par le canal Nav1.9 soit négativement régulé par le froid rend l'explication de sa contribution à la sensibilité au froid difficile. Il serait tout de même intéressant d'observer le comportement de neurones Nav1.9^{+/+} vs Nav1.9^{-/-} soumis à une rampe froide, en configuration cellule entière. De cette manière, nous serions capables d'observer les bouffées de PA émises par les neurones en réponse à une telle stimulation et de corrélérer ou non ces résultats avec l'expérience d'imagerie calcique. Il n'est pas non plus impossible que le canal Nav1.9 soit soumis à une régulation particulière dans les neurones sensibles au froid. Pour vérifier cela, la sensibilité au menthol ou à l'AITC des neurones patchés devra être testée après enregistrement du courant Nav1.9 pour définir 3 groupes neuronaux (TRPM8-positifs, TRPA1-positifs, et autres) et voir si la même observation quant à la régulation du courant Nav1.9 par le froid peut être réalisée au sein de ces 3 groupes.

Enfin, le rôle du calcium intracellulaire dans la sensibilité au froid peut être une voie d'investigation intéressante. Les neurones sensibles au froid sont en effet capables de répondre par une augmentation rapide du calcium cytosolique en provenance de pools cellulaires (Thut et al., 2003). Cette vague calcique serait directement responsable de l'activation du canal TRPA1 (Zurborg et al., 2007) mais pourrait également modifier l'activité du canal Nav1.9 en activant par exemple la PKC.

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine

Cette hypothèse peut être vérifiée simplement en imagerie calcique, en inhibant la PKC dans des neurones Nav1.9^{+/+} et Nav1.9^{-/-} soumis à un refroidissement.

2. ROLE DU CANAL NAV1.9 DANS L'HYPERSENSIBILITE AU FROID INDUITE PAR L'OXALIPLATINE

La délétion du gène *SCN11A* est à l'origine d'une température d'apparition de l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine plus basse chez les souris KO (10°C) que chez les souris sauvages (20°C). Nous avons de plus constaté une réduction significative de l'intensité de cette hypersensibilité pour les températures de 10 et 5°C (considérée comme de l'hyperalgie). Le canal Nav1.9 est donc indispensable à l'apparition de l'allodynie au froid ($\geq 15^\circ\text{C}$, idée renforcée par l'absence de réponse des souris KO au test de l'acétone), mais il contribue également à l'hyperalgie au froid ($\leq 10^\circ\text{C}$), certainement avec un ou plusieurs autres acteurs essentiels puisqu'il ne permet pas une restauration complète des seuils de nociception. L'implication du canal Nav1.9 dans l'allodynie au froid, et ce dès 20°C, est paradoxale au vu des températures extrêmes ($\leq 5^\circ\text{C}$) impliquant le canal Nav1.9 chez l'animal sain. Il n'est donc pas exclu qu'il existe une régulation particulière du canal Nav1.9 par l'oxaliplatine, impliquant le canal Nav1.9 dans l'hypersensibilité induite par l'oxaliplatine via un mécanisme dépassant son rôle dans la sensibilité au froid physiologique.

Nous n'avons pas mis en évidence de surexpression du canal Nav1.9 chez le rat après injection d'oxaliplatine. Il faudra cependant valider cette observation chez la souris, modèle chez lequel nous avons réalisé la majeure partie des expériences comportementales. L'expression du canal devra de plus être étudiée par immunohistochimie pour éliminer une possible régulation post-transcriptionnelle comme observé suite à une inflammation plantaire subaiguë dans la première partie de la thèse. Une régulation positive du canal Nav1.8 a par exemple été montré chez la souris suite à une injection unique d'oxaliplatine (Descoeur et al., 2011), et il n'est pas impossible que des mécanismes différents aient lieu entre le rat et la souris.

Nous n'avons pas à l'heure actuelle suffisamment d'éléments pour expliquer par quel mécanisme l'oxaliplatine agit sur l'excitabilité neuronale et implique le canal Nav1.9. Le rôle des espèces oxygénées réactives dans la toxicité neurosensorielle de l'oxaliplatine a par exemple été démontré, impliquant une surexcitabilité des fibres C IB4-positives non dépendante des voies de signalisation canoniques de la cellule (calcium intracellulaire, PKA et PKC, Joseph et al., 2008). Cependant, ce phénomène semblerait impliquer largement le canal TRPA1, sensibilisé *in vivo* par le stress oxydant (del Camino et al., 2010), et dont le blocage ou le knock-out permet de supprimer totalement l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine. Le HC-030031 (antagoniste TRPA1)

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine

permet en effet de réduire l'hypersensibilité mécanique (test de von Frey) et thermique (immersion de la queue à 10°C) chez le rat (Nassini et al., 2011). Dans la même étude, les auteurs montrent que le KO TRPA1 chez la souris permet de réduire l'hypersensibilité mécanique (von Frey) et l'allodynie au froid (test de l'acétone). Le résultat obtenu avec le HC-030031 sur l'hypersensibilité mécanique a été retrouvé chez la souris (Descœur et al., 2011), mais l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine, évaluée par le test de la rampe froide dans ce second article, n'est pas corrigée par le traitement au HC-030031. Concernant les canaux Nav cependant, aucune preuve expérimentale ne nous permet à l'heure actuelle de faire un lien direct entre le stress oxydant et leur fonction. Un impact éventuel des espèces oxygénées réactives pourra faire l'objet d'une expérience simple, consistant à observer en patch clamp l'effet de molécules réactives sur le courant Nav1.9 (4-hydroxynonanal ou directement H₂O₂, comme utilisé pour montrer l'activation du canal TRPA1 par les espèces oxygénées réactives, Andersson et al., 2008).

Une autre hypothèse mécanistique évoquée est le rôle du calcium extracellulaire. L'oxalate, produit par le métabolisme de l'oxaliplatine, induirait une modification de la charge membranaire par chélation des cations divalents, notamment du calcium extracellulaire. Le calcium et l'oxalate étant excrétés ensemble, l'homéostasie calcique serait fortement perturbée et ceci pourrait en partie être à l'origine des troubles neurosensoriels observés (Gamelin et al., 2007). En effet, les perfusions de Mg²⁺/Ca²⁺ permettent d'améliorer significativement les symptômes douloureux induits par l'oxaliplatine chez le rat (Ling et al., 2007a) comme chez l'Homme (incidence et intensité, Gamelin et al., 2004). D'après les auteurs de ce dernier article, cette forte déplétion en calcium perturberait la fonction des canaux Nav en modifiant la charge membranaire. Un effet positif de la lidocaïne ou de la mexilétine (deux bloqueurs non-spécifiques des canaux Nav) par voie systémique sur l'hypersensibilité mécanique et thermique (au froid) induite par l'oxaliplatine a pu être montré chez le rat (Ling et al., 2007a; Egashira et al., 2010), appuyant cette hypothèse. Il a de plus été montré que l'injection d'oxalate provoquait l'apparition d'une hypersensibilité au froid chez le rat, sans induire d'allodynie mécanique (Sakurai et al., 2009), ce dernier symptôme étant spécifiquement induit par le diaminocyclohexane-platine, métabolite actif de l'oxaliplatine. L'administration de calcium permet de plus de prévenir l'apparition de l'hypersensibilité au froid spécifiquement. L'oxalate pourrait donc bien agir sur les canaux Nav via une déplétion calcique, induisant une hypersensibilité au froid, ce qui irait dans le sens de nos résultats impliquant le canal Nav1.9 dans l'hypersensibilité au froid spécifiquement. L'effet de l'oxaliplatine et de l'oxalate sur le courant Nav1.9 pourrait être observé en patch clamp, et leur effet sur l'émission de PA (en configuration cellule entière) pourrait également être observé en comparant des cellules Nav1.9^{+/+} et Nav1.9^{-/-}. Cette technique nous permettrait

Contribution du canal Nav1.9 à la perception du froid nociceptif et à l'hypersensibilité douloureuse induite par l'oxaliplatine

également de tester l'impact d'une augmentation du calcium extracellulaire sur l'excitabilité des neurones Nav1.9^{+/+} et Nav1.9^{-/-}.

Un modèle de neuropathie chimio-induite par traitement chronique à l'oxaliplatine a été mis au point chez le rat au laboratoire (Ling et al., 2007a), et est également réalisable chez la souris (Renn et al., 2011). Chez le rat, une hypersensibilité au chaud, symptôme présent chez l'Homme (Attal et al., 2009), est également observée après quelques jours, signe que des mécanismes différents se mettent en place sur le mode chronique. Dans une perspective à visée plus proche de la clinique, nous devrions valider notre concept sur ce modèle, reproduisant plus fidèlement le mode de traitement comme la symptomatologie clinique. Ceci nous permettrait d'observer si le canal Nav1.9 est d'avantage impliqué dans la mise en place de l'hypersensibilité que dans son maintien (comme nous l'avons montré pour l'inflammation chronique sur le modèle de monoarthrite). De plus, nous avons montré sur le mode aigu que le canal Nav1.9 était spécifiquement impliqué dans l'hypersensibilité au froid (pas d'impact du KO sur l'hypersensibilité mécanique). Son implication dans l'hypersensibilité thermique au chaud devrait être testée. Il serait enfin très intéressant de combiner ce modèle de neuropathie chimio-induite avec le blocage pharmacologique du canal Nav1.9 par la drosotoxine. Par une telle étude, nous pourrions de plus déterminer si la drosotoxine présente un intérêt préférentiellement préventif ou curatif. En effet, les symptômes neurotoxiques de l'oxaliplatine sur le mode aigu sont un critère prédictif de l'apparition d'une neuropathie après traitement chronique (Attal et al., 2009), et un effet préventif sur l'apparition d'une neuropathie pourrait être possible. L'objectif serait alors de comparer l'effet d'un traitement préventif par la drosotoxine, administrée tout au long des cures de chimiothérapies, avec l'effet d'un traitement curatif, administré à la fin des cures, quand les symptômes douloureux sont installés. L'utilisation de ce modèle chronique, plus proche de la clinique, combinée à un blocage pharmacologique du canal Nav1.9, pourrait se révéler plus prédictive quant à l'intérêt du canal Nav1.9 en tant que cible thérapeutique pour la prise en charge de la neuropathie chimio-induite par l'oxaliplatine chez l'Homme.

CONCLUSION GENERALE

Ce travail de thèse a permis de caractériser le rôle joué par le canal sodique Nav1.9 dans la douleur inflammatoire aiguë à chronique. L'utilisation de différents modèles (souris knock-out ou rat traité par antisens) ainsi que la confrontation de données comportementales (acquises par différents tests de sensibilité thermique et mécanique), moléculaires/cellulaires et électrophysiologiques nous a permis de tirer des conclusions claires quant au rôle joué par le canal Nav1.9 dans la douleur inflammatoire *in vivo*, et d'apporter des éléments de réponse importants quant à son mode d'implication dans ce type de douleur. Il contribue en effet à la génération de douleurs aiguës spontanées ainsi qu'à l'hypersensibilité douloureuse au chaud et à la pression mécanique induite par une inflammation aiguë ou chronique. La réduction de la douleur induite par une inflammation articulaire chronique (monoarthrite), et notamment du déséquilibre postural qui en découle, est particulièrement intéressante si l'on considère la forte incidence de pathologies inflammatoires articulaires chez l'Homme. Parallèlement à ces résultats comportementaux, nous avons montré une surexpression de canaux Nav1.9 au niveau des corps cellulaires des fibres afférentes primaires et des troncs nerveux cutanés suggérant une augmentation du transport axonal de ces canaux vers la périphérie. Ces canaux se sont révélés être non fonctionnels au niveau des corps cellulaires et nous proposons donc qu'ils constituent un pool de réserve destiné à augmenter l'excitabilité des terminaisons nerveuses.

La conduite d'un projet de recherche parallèle nous a également permis de montrer l'implication du canal Nav1.9 dans la sensibilité douloureuse au froid, à la fois physiologique et pathologique. En effet, le knock-out de Nav1.9 chez la souris, comme son knock-down chez le rat, induisent une hyposensibilité au froid intense (< 5 à 12°C selon les tests). Chez l'Homme, la chimiothérapie anticancéreuse par perfusion d'oxaliplatine est connue pour induire une forte hypersensibilité douloureuse, notamment au froid, pouvant altérer la qualité de vie des malades au point d'être à l'origine d'un arrêt prématuré du traitement. Nous montrons également que le canal Nav1.9 joue un rôle important dans l'hypersensibilité au froid (allodynie et hyperalgie) induite par l'oxaliplatine chez la souris et le rat.

Notre étude ouvre donc des perspectives de recherche nouvelles, tant sur le plan fondamental que préclinique. En effet, nous proposons tout d'abord pour la première fois que le canal Nav1.9 soit un acteur de la perception physiologique du froid intense. Bien que les mécanismes impliquant le canal Nav1.9 dans ce phénomène soient à l'heure actuelle encore inconnus, ce constat apporte un nouvel élément à intégrer pour la compréhension de la transduction sensorielle du froid par les fibres

Conclusion générale

afférentes primaires. Sur le plan préclinique, nous montrons que le ciblage pharmacologique du canal Nav1.9 dans le cadre de douleurs inflammatoires d'étiologies très diverses, mais également de la neuropathie chimio-induite par l'oxaliplatine, pourrait s'avérer efficace dans la réduction de l'hypersensibilité douloureuse, spécifiquement, avec un ratio bénéfice/risque très intéressant lié à la spécificité du canal Nav1.9 pour les voies périphériques de la douleur.

La découverte récente d'une toxine, la drosotoxine, inhibant spécifiquement l'activité du canal sodique Nav1.9, devrait justement permettre de confirmer ces observations par la pharmacologie. Elle est non cytotoxique et son administration *in vivo* par voie systémique ne produit pas d'effets indésirables, mais permet de réverser l'hypersensibilité thermique et mécanique induite par une inflammation plantaire subaiguë comme ce que nous avons observé chez la souris knock-out ou le rat traité par injections d'antisens anti-Nav1.9. Nous avons donc l'espoir que le blocage du canal Nav1.9 puisse un jour faire partie de l'arsenal thérapeutique des cliniciens pour le traitement des troubles douloureux inflammatoires et de certains cas de neuropathies sensorielles.

MATERIEL ET METHODES

1. ANIMAUX

Les expérimentations sont réalisées en accord avec le texte de loi régissant l'expérimentation animale en Europe, "European Community guiding in the care and use of animals" (86/609/CEE). Les recommandations du comité d'éthique de l'association internationale pour l'étude de la douleur (IASP) ont également été suivies (Zimmermann, 1983). La certification à expérimenter sur animaux vivants n°63-185 a été délivrée par la préfecture du Puy-de-Dôme. Enfin, les protocoles utilisés ont tous fait l'objet d'une validation par le Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale Auvergne (n°CE13-10, CE09-08 et CE07-08). Les animaux sont stabulés en atmosphère régulée (pression et hygrométrie), en cycle jour-nuit de 12 h / 12 h, et ont un accès illimité à l'eau et à la nourriture.

Les souris utilisées (20-35 g, mâles) sont de souche C57Bl6/J et les rats (150-175 g, mâles) de souche Sprague Dawley. Les rats, ainsi que les souris utilisées pour les expériences ne nécessitant pas de comparaison avec un groupe KO, proviennent des laboratoires Charles River. Ces animaux ne sont utilisés qu'après une semaine de repos et d'habituatation aux conditions de l'animalerie. Les souris transgéniques (voir chapitre 1.1) et leurs congénères WT sont quant-à-elles issues de la reproduction. Les animaux nés à l'animalerie sont sevrés aux alentours de 15 g (env. 4 semaines), séparés en fonction de leur génotype (voir chapitre suivant), puis inclus dans les protocoles expérimentaux une fois le poids de 20 g atteint. A ce stade, un aveugle est réalisé pour que l'expérimentation soit faite sans connaissance du génotype.

1.1. Souches transgéniques

La souche Nav1.9^{-/-} a été générée par Glaxo Smith Kline à partir d'un fond C57Bl6/J comme décrit par François Maingret et al. (2008). Une cassette stop/IRES/LacZ-pA, suivie d'une seconde cassette loxP/neo/loxP, ont été insérées entre les exons 5 et 8 du gène *Scn11a* (voir Figure 54). Ceci résulte en une délétion des exons 6 et 7, et en la production d'une protéine tronquée non fonctionnelle.

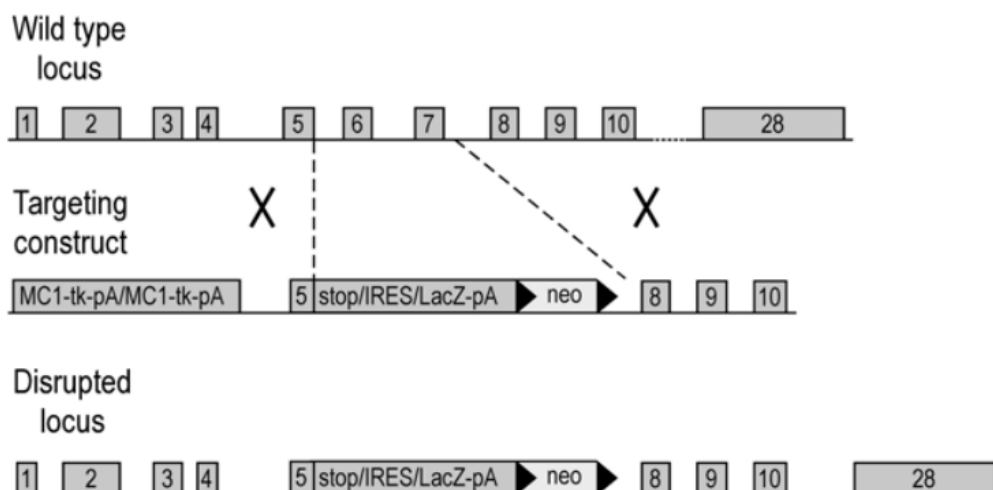


Figure 54. Construction de la souche de souris KO Nav1.9.

Cette figure représente l'allèle wild-type, le vecteur transfecté, et l'allèle muté issu de la recombinaison homologue entre les deux premiers (représentée par les lignes pointillées). Les carrés représentent les exons, les triangles noirs représentent les sites **loxP** spécifiques de la recombinaise Cre (permettant l'excision du fragment encadré). La double cassette **MC1-tk-pA** codant pour une thymidine kinase d'Herpès Simplex Virus permet un crible négatif des cellules dans lesquelles la recombinaison n'a pas eu lieu (par ajout du substrat 1-(2-desoxy-2-fluoro-β-D-arabinofuranosyl)-S-iodouracil, dont le métabolite est toxique). Le crible positif est réalisé grâce à l'insertion d'une cassette **neo** conférant la résistance à la néomycine. Le transgène, outre la cassette neo, contient 3 éléments : un codon **stop** mettant fin prématurément à la traduction de la protéine Nav1.9, un site interne d'entrée des ribosomes (**IRES** pour "Internal Ribosome Entry Site") permettant l'initiation d'un nouveau transcrit après le codon stop, ce transcrit étant le gène rapporteur **LacZ-pA**, codant pour l'enzyme dégradant le X-Gal et formant un précipité bleu (Maingret et al., 2008).

Le génotypage est effectué sur un petit prélèvement de poils réalisé sous l'abdomen. Cette technique, mise au point dans le cadre de cette thèse, présente les avantages d'être très rapide, de ne pas être traumatisante pour les animaux (en comparaison à une amputation de l'extrémité de la queue), d'être réalisable sans anesthésie, et autorise par la suite l'inclusion des animaux génotypés dans des protocoles expérimentaux. Une petite touffe de poils est prélevée sous l'abdomen à l'aide d'une pince. Les follicules pileux sont lysés par du NaOH 50 mM pendant 5 min à 100°C. La solution est neutralisée au Tris-HCl après une forte agitation au vortex. Après centrifugation et incubation à 65°C pendant 5 min, les échantillons sont directement analysés par PCR en prélevant un volume arbitraire de 8 µl. Pour la réaction de PCR, le kit AmpliTaq d'Applied Biosystems est utilisé. 4 amorces sont intégrées dans le mix de PCR : Nav1.9 WF (5'-TGCTTTGTAGATACGTCTTCATTGGG-3'), Nav1.9 WR (5'-

ACCATACTGTGACTAGCATTAAATCCTC-3'), Nav1.9 MF (5'-AATGGGCTGACCGCTTCCTCGTG-3') et Nav1.9 MR (5'-CAAAGCTGGACAAGACTCAGCTAT-3'). La bande Nav1.9 WT à 480 bp et la bande Nav1.9 KO à 430 bp (voir Figure 55). La migration est effectuée dans un gel d'agarose 1,5% et la révélation est réalisée par marquage à l'EZ-Vision (Mandel, intercalant non-toxique, substitut du bromure d'éthidium).

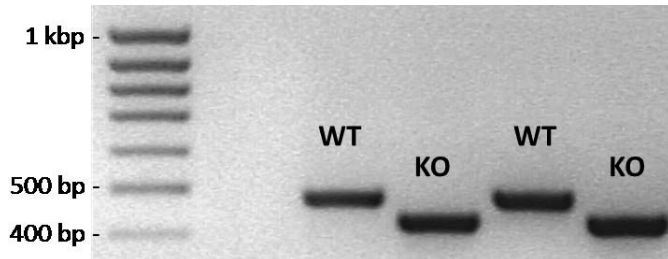


Figure 55. Exemple d'un résultat de génotypage des souris WT et KO Nav1.9.

La PCR (kit AmpliTaq, Applied Biosystems) est réalisée sur échantillons d'ADN issus de follicules pileux. La migration est réalisée à 180V dans un gel d'agarose à 1,5%. Les amplicons sont détectés grâce au marqueur EZ-Vision (Mandel). Les bandes attendues sont de 430 bp pour l'allèle KO et de 480 bp pour l'allèle WT.

1.2. Modèles et traitements

NB : toutes les injections intraplantaires sont réalisées dans la patte arrière gauche (sauf pour le formaldéhyde, injecté dans la patte arrière droite).

toutes les drogues utilisées, sauf indication contraire, sont injectées à pH 7-7,2.

le sérum physiologique est préparé au laboratoire : NaCl 0,9% dans l'eau déminéralisée, pH 7, autoclavé et stocké à 4°C.

L'inflammation aiguë est induite chez la souris par injection de 15 µl de formaldéhyde dilué à 5% dans du sérum physiologique au niveau de la patte arrière droite, ou de 10 µl de formaldéhyde 2% dans la lèvre supérieure droite (voir chapitre 2.1, p. 158).

L'inflammation subaiguë est induite par injection intraplantaire de 20 µl (souris) ou 50 µl (rat) de carragénine λ diluée à 3% dans du sérum physiologique. Les tests sont réalisés à 2, 4, 6 8 et 24 h post-injection chez la souris, et à 4 h chez le rat.

L'inflammation chronique (monoarthrite) est induite chez la souris sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane 2% par deux injections sous-cutanées de 15 µl de CFA contenant 5 µg/µl de *Mycobacterium tuberculosis* stérilisés, de chaque côté de l'articulation tibio-tarsale (~cheville) (Chillingworth et Donaldson, 2003). Les tests sont réalisés aux jours 3, 7, 10, 14 et 21 suivant l'induction du modèle. **L'indométacine**, anti-inflammatoire utilisé comme contrôle positif, est administrée quotidiennement à l'aveugle par voie intrapéritonéale, en suspension dans la méthylcellulose 0,5% et à la dose de 1 mg/kg.

NB : le suivi de la réaction inflammatoire est effectué par mesure de l'œdème plantaire ou articulaire (selon le modèle considéré) à l'aide d'un micromètre.

L'**iciline et le cinnamaldéhyde** (Sigma) sont injectés en intraplantaire dans un volume de 25 μ l à la dose de 14 mM. L'iciline est dissoute dans un mélange de sérum physiologique et de diméthylsulfoxyde (1:1). Le cinnamaldéhyde est dissout dans du sérum physiologique 0,5% Tween-80.

La **neuropathie** est induite chez la souris comme chez le rat par une injection unique d'oxaliplatine à la dose de 6 mg/kg, diluée à 1 mg/ml dans une solution de glucose 5% dans de l'eau. Chez la souris, les tests sont effectués entre 72 et 120 h post-injection. Chez le rat, les tests sont effectués 72 h post-injection (pendant ces 72 h, le traitement antisens est administré).

Le **knock-down** de Nav1.9 est réalisé chez le rat par injection intrathécale³⁰ d'ODN antisens (5'-GCTCTGTTCTTGAGCTTTCTC-3'), complémentaires du transcrit Nav1.9 (Porreca et al., 1999). Les ODN sont dilués dans du sérum physiologique et administrés 2 fois par jour pendant 3 jours (toutes les 12 h) avant les tests comportementaux à une dose de 12,5 μ g par injection et dans un volume de 10 μ l. Un groupe d'animaux reçoit des ODN "Mismatch" ne ciblant aucun transcrit (5'-GCCTGTCTTTGGACTTCTTC-3'), et un autre groupe reçoit le véhicule seul pour s'assurer que les ODN n'induisent pas d'effet par eux-mêmes. Les traitements sont administrés en aveugle.

2. TESTS COMPORTEMENTAUX

2.1. Test de douleur aiguë spontanée (formol)

Les souris sont habituées pendant 20 min à l'enceinte de test constituée d'une face transparente en plexiglass et de 3 miroirs (25x25x60 cm). Après l'injection sous cutanée de formaldéhyde (voir p. 157) dans la patte arrière (15 μ l, 5%) ou la lèvre supérieure droite (10 μ l, 2%), le léchage des animaux est chronométré pendant 45 min par tranches de 5 min (formol plantaire) ou 3 min (formol facial). Une sommation du temps de léchage est faite pour les deux phases du test : 0 à 5/3 min (plantaire/facial) pour la phase d'irritation, et 10/9 min (plantaire/facial) à 45 min pour la phase de douleur inflammatoire. L'expérience de formol facial a été menée à l'U929 INSERM avec l'aide du Pr Philippe Luccarini.

2.2. Test de von Frey

Ce test consiste en l'application de filaments de von Frey de force croissante (0,008 à 2 g) perpendiculairement à la voûte plantaire de l'animal jusqu'à ce que le filament se courbe (voir Figure 56). Cette opération est répétée 5 fois par filament et les filaments sont passés par ordre de force

³⁰ L'injection se fait sous anesthésie légère à l'isoflurane, entre les vertèbres L5 et L6, selon la procédure décrite par Christine Mestre et al. (1994).

croissante. Le premier filament induisant au moins 3 réponses (retrait, léchage de la patte) sur 5 est retenu comme le seuil de douleur de l'animal en grammes. Pour ce test, les animaux sont placés dans des boîtes opaques (85x35 mm) fermées sur le dessus, et à fond grillagé pour permettre l'accès à la voûte plantaire, 1 h avant le début du test.

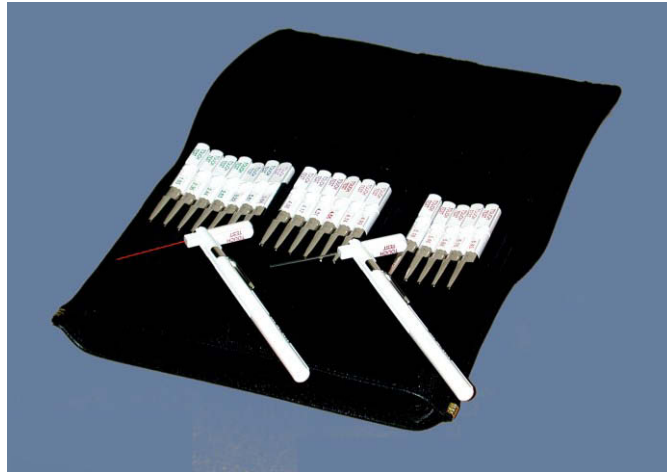


Figure 56. Kit complet de filaments de von Frey.
Source : <http://www.koreatechinc.com>

2.3. Dynamic Weight Bearing

Ce nouveau test a été mis au point au laboratoire dans le cadre de cette thèse. La distribution pondérale des souris sur leurs quatre membres (ainsi que sur un cinquième appuis artificiel nommé "autres", regroupant abdomen, queue et testicules) est évaluée grâce à ce système (Bioseb) qui consiste en une cage de 11x11x22 cm dont le sol est tapissé d'un maillage de 44x44 capteurs de pression, permettant une mesure en temps réel du poids appliqué par l'animal sur chacun de ses membres (voir Figure 57).



Figure 57. Le Dynamic Weight Bearing.

Cette photo illustre un rat dans la cage tapissée de capteurs. La caméra permet *a posteriori* d'attribuer les appuis enregistrés aux différents membres de l'animal pour l'analyse. Source : <http://www.bioseb.com>

Les animaux sont laissés en champ libre dans le système pendant 5 min durant lesquelles ils sont filmés et la pression appliquée sur les capteurs est enregistrée à une fréquence de 10 Hz. A l'aide du logiciel Dynamic Weight Bearing v1.3.2h, chaque point de pression dépassant les seuils de surface et de poids déterminés de manière automatique par le logiciel est attribué à un appui précis de l'animal (patte arrière droite, pattes avant groupées, groupe "autres"... etc.). Les résultats retenus comme critères d'évaluation de la douleur sont le ratio de poids ipsi/controlatéral des pattes arrières, le poids appliqué sur les pattes avant, et le pourcentage de temps passé avec la patte injectée en suspension.

2.4. Test de pression de la patte

Ce test est réalisé chez le rat grâce à un analgésimètre de Randall et Selitto (Ugo Basil). Une pression croissante est appliquée sur la patte de l'animal jusqu'à vocalisation. La pression maximale est définie à 450 g pour éviter de léser la patte. Deux passages sont réalisés (voir un troisième en cas de valeur aberrante) et moyennés pour déterminer le seuil de douleur de l'animal en grammes.

2.5. Tests d'immersion de la patte et de la queue

La patte ou la queue de l'animal sont plongés dans un bain-marie agité et thermostaté jusqu'au retrait. La latence de retrait est chronométrée et l'opération est répétée après 2 min. Les deux

premières latences obtenues ne différant pas de plus d'une seconde sont retenues et moyennées pour définir le seuil de douleur de l'animal en secondes. Un cut-off de 15 s est défini pour éviter toute lésion. Pour la souris, il est nécessaire de contenir les animaux dans un carré de tissu et de les habituer à cette contention ainsi qu'à l'expérimentation plusieurs jours avant le début du protocole, jusqu'à ce qu'ils aient un comportement calme et montrent des seuils reproductibles.

2.6. Test de préférence thermique

Ce système (Bioseb) consiste en deux plaques dont la température peut-être définie par l'expérimentateur, entourées d'une cloison (33x16,5x30 cm), et sur lesquelles une souris peut se déplacer librement. Une plaque dite "de référence" est placée à 25°C tandis que la plaque "test" est placée à une température définie par le protocole expérimental. La souris est déposée dans l'obscurité sur l'une ou l'autre des plaques (de manière randomisée), et ses déplacements sont suivis à l'aide d'une caméra infrarouge. L'obscurité a pour but de limiter le stress chez l'animal et de favoriser un comportement d'exploration. La valeur retenue est le temps passé sur la plaque test, en secondes. Un second passage est réalisé en inversant les températures des deux plaques, et les deux scores sont moyennés.

2.7. Test de la plaque froide

Les animaux sont déposés sur une plaque à 25°C (16,5x16,5 cm), fermée par une cage en plastique transparent, pour habitude pendant 5 min. L'animal est ensuite redéposé dans sa cage le temps de réduire la température de la plaque à 0°C ou 6°C, puis il est repositionné sur la plaque jusqu'à produire un comportement douloureux (saut ou léchage des pattes, cut-off de 30 s à 0°C, 60 s à 6°C). Le seuil de douleur est défini par la latence de léchage des pattes avant en secondes. Les animaux montrant un comportement de "freezing" (prostration) sont éliminés.

2.8. Test de la rampe froide

Les souris sont placées sur une plaque à 25°C dans l'obscurité. Le système utilisé est le même que celui décrit pour la plaque froide (voir 2.7). La température est descendue à 0°C au rythme de 1°C/min et de façon linéaire. Les sauts produits par l'animal sont comptabilisés par tranches de 1 min (ou par °C).

2.9. Test de l'acétone

Les souris sont positionnées sur la grille et dans les compartiments du test de von Frey (voir chapitre 2.2). Après 1 h d'habituation, une goutte d'acétone à température ambiante est déposée sous la voûte plantaire des animaux à l'aide d'une pipette, produisant un refroidissement léger par évaporation rapide. C'est le temps de léchage en secondes qui est pris en compte pour caractériser la sensibilité au froid.

3. IMMUNOHISTOCHEMIE

Protocole "tissus non fixés - congelés" (Françoise Padilla, UMR CNRS 6231, équipe P Delmas) :

Les animaux sont euthanasiés par décapitation après anesthésie à l'isoflurane. Les DRG et les échantillons de peau sont rapidement prélevés et incubés 1 h dans du tampon phosphate (PBS pour "Phosphate Buffer Saline") 4% sucrose puis 1 h dans du PBS 15% sucrose avant d'être inclus dans du milieu Tissue-TEK OCT et congelés dans l'isopentane refroidi à -60°C (bain-marie de carboglace/éthanol). Des coupes de 14 µm sont réalisées au cryostat et fixées sur lames SuperFrost Plus. Les lames sont incubées dans le tampon de blocage (PBS 0,1% triton X-100, 3% albumine de sérum bovin) pendant 1 h. Les anticorps primaires sont ensuite mis au contact des coupes dans le tampon de blocage sans triton X-100, à 4°C pendant une nuit (anti-Nav1.9, clone L23 (Padilla et al., 2007), lapin, et anti-Périphérine (Chemicon), souris, tous deux au 1/400). Après plusieurs lavages dans le PBS, les lames sont incubées avec les anticorps secondaires dans le tampon de blocage sans triton X-100 pendant 1 h à température ambiante (anti-lapin, chèvre, Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) et anti-souris, chèvre, Alexa Fluor 546 (Molecular Probes), tous deux au 1/400). Après plusieurs lavages dans le PBS, les lames sont montées avec du Mowiol. L'observation est réalisée sur un microscope à épifluorescence classique muni du logiciel d'acquisition CellR (Olympus) pour les coupes de DRG, et sur un microscope à illumination structurée Apotome (Zeiss) pour les coupes cutanées. L'édition des images est réalisée à l'aide du logiciel Photoshop (Adobe). Les clichés (8 bits, 256 niveaux de gris) sont tous réalisés avec les mêmes paramètres d'acquisition, de fluorescence et d'exposition, et ont fait l'objet d'un traitement identique. De plus, les échantillons d'une même expérience sont traités par des anticorps issus d'un lot unique. La quantification du marquage Nav1.9 dans les DRG est réalisée à l'aide du logiciel CellR. Une région d'intérêt de 5,3 µm de diamètre est définie dans le cytoplasme des neurones, et le bruit de fond (mesuré sur 3 régions distinctes par cliché) est enfin soustrait à la fluorescence mesurée dans chaque cellule.

Protocole "tissus fixés - paraffine" (UMR INSERM 766, équipe A Eschalier) :

Les animaux sont euthanasiés par décapitation après anesthésie à l'isoflurane. Les DRG et les échantillons de peau sont rapidement prélevés et incubés 2 h dans une solution de paraformaldéhyde 4% (pH 7,4). Les DRG sont ensuite déshydratés et imprégnés de paraffine dans un automate STP120 (Microm) selon la séquence de bains suivante : 60 min éthanol 70%, 60 min éthanol 95%, 90 min éthanol 100%, 45+45+60 min éthanol 100%, 30+60+90 min toluène, 90+120 min paraffine à 56°C. Les DRG sont ensuite inclus dans des blocs de paraffine et stockés à température ambiante. Les coupes sont réalisées avec une épaisseur de 5 µm puis déparaffinées/réhydratées selon la séquence de bains suivante : 30 min à l'air libre à 56°C, 3 x 5 min xylène, 2 x 5 min éthanol 100%, 2 x 5 min éthanol 95%, 2 x 5 min eau distillée. Un démasquage des épitopes est ensuite réalisé par incubation des lames 20 min à 100°C dans un tampon de tri-sodium citrate à 10 mM et les peroxydases endogènes sont inhibées par un traitement de 10 min au peroxyde d'hydrogène 3%. Après 1 h de blocage (sérum de veau foetal), l'anticorps primaire (anti-Nav1.9 #ASC-017, Alomone, lapin, dilué au 1/200) est incubé à 4°C sur la nuit dans le tampon Dako S2022. L'anticorps secondaire (anti-lapin conjugué à la biotine, #K0690, Dako) est ensuite incubé 30 min à température ambiante dans le tampon fourni. Une amplification est réalisée par incubation d'un complexe streptavidine/HRP (peroxydase de radis noir, Dako) pendant 30 min, puis la révélation est effectuée par mise en contact des coupes avec le chromogène diaminobenzidine (Dako) jusqu'à obtention d'une coloration suffisante (les lames étant toutes incubées pendant un temps égal). Les lames sont ensuite montées en milieu de montage aqueux et les clichés de microscopie sont réalisés en lumière blanche sur un microscope Eclipse E800 équipé d'une caméra digitale (Nikon).

4. RT-PCR QUANTITATIVE

4.1. Extraction d'ARN et rétrotranscription

Les animaux sont sacrifiés par décapitation après anesthésie à l'isoflurane. Les DRG sont prélevés rapidement en immersion dans du PBS 10 mM acide éthylène diamine tétracétique (EDTA) refroidis dans la glace, congelés dans l'azote liquide, puis stockés à -80°C. Pour les expériences nécessitant de travailler sur les DRG innervant la patte, les ganglions L4 à L6 sont prélevés en séparant les DRG ipsi et controlatéraux (rat ou souris). Pour assurer une quantité d'ARN suffisante, chaque échantillon est le résultat d'un pool de DRG issu de 5 animaux différents (soit 15 DRG ipsi et 15 DRG controlatéraux). Pour les autres expériences (*i.e.* la qPCR KO Nav1.9 vs WT) un maximum de DRG est prélevé entre les segments T12 et L6 (env. 12 à 14 DRG) et chaque échantillon est constitué d'un pool de DRG provenant d'un animal unique. Les ARN sont extraits grâce au kit RNeasy mini (Qiagen) selon

Matériel et méthodes

les instructions fournies, en incluant une étape de traitement à la DNase I (Qiagen) destinée à dégrader l'ADN génomique. Les ARN purifiés sont quantifiés par mesure de l'absorbance à 260 nm (A260) sur un spectrophotomètre V-550 (Jasco), la qualité est évaluée par analyse des ratios A260/A280 et A260/A230, et leur intégrité est évaluée par électrophorèse dans un gel d'agarose 1,5%. La rétrotranscription est ensuite effectuée sur 1 µg d'ARN dans un volume de 20 µl avec le kit de rétrotranscriptase Superscript II (Invitrogen), en suivant le protocole fourni.

4.2. qPCR

Les amplifications de PCR sont réalisées sur système Mastercycler ep realplex (Eppendorf). Tous les échantillons sont analysés en tripliquets dans un volume final de 6,3 µl contenant 1,3 µl d'ADNc dilués au 1/40, 500 nM d'amorces, 3 mM de MgCl₂, et le mix LightCycler Fast-Start SYBR Green (Roche). Avant la PCR, une étape d'activation de la polymérase est réalisée pendant 8 min à 95°C. Le protocole d'amplification consiste ensuite en 10 s de dénaturation à 95°C, 5 s d'hybridation à la température T_h (voir Tableau 6), et 10 s d'élongation à 72°C, répété pendant 40 cycles. La température d'hybridation optimale est déterminée expérimentalement par la réalisation d'un gradient de température. La spécificité de l'amplification est vérifiée par analyse de la courbe de fusion (acquise sur une rampe de 95 à 60°C en 10 min, avec suivi de la fluorescence en temps réel) et par électrophorèse sur gel d'agarose 3%. Les couples d'amorces (voir Tableau 6) n'étant pas issus de la bibliographie sont dessinées de façon à recouvrir un intron pour éviter l'amplification d'ADN génomique résiduel. Les quantités relatives d'ADNc sont déterminées en fonction du cycle de sortie (Ct) par rapport à une gamme de dilution d'ADNc de 1/10 à 1/640 (facteur 2). Pour chaque échantillon, la quantité relative d'ADNc d'un gène d'intérêt est enfin normalisée par la quantité relative du gène de ménage HPRT ("Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyltransferase"). Ce gène a été retenu parmi 5 gènes de ménage (HPRT, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase ou GAPDH, β2-microglobuline, ARN ribosomal 18S, β-actine) dont la stabilité d'expression a été analysée sur des échantillons d'animaux enflammés (2, 8 et 24 h post-carragénine) vs non enflammés.

Espèce	Transcrit	RefSeq	Séquences primers 5'→3'	Th (°C)	Taille amplicon (pb)	Taille amplicon génomique (pb)	Référence
Souris/ Rat	HPRT	NM_013556	For : TTGCTGACCTGCTGGATTAC Rev : AGTTGAGAGATCATCTCCAC	64	149	6530	Laboratoire de Nutrition Humaine (Clermont-Fd)
Souris	GAPDH	NM_008084	For : AATGTGTCCGTCGTGGATCTGA Rev : GATGCCTGCTTACCACCTTCT	61	83	83	(Boley et al., 2002)
Souris	β2-microglobuline	NM_009735	For : ATTCACCCCACTGAGACTG Rev : TGCTATTCTTCTGCGTGC	62	193	1663	(Kadl et al., 2002)

Espèce	Transcrit	RefSeq	Séquences primers 5'-->3'	Th (°C)	Taille amplicon (pb)	Taille amplicon génomique (pb)	Référence
Souris	ARN 18S	NR_003278	For : TTGACGGAAGGGCACCACCAG Rev : GCACCACCACCCACGGAATCG	60	129	129	(Rhinn et al., 2008)
Souris	β -actin	NM_007393	For : CAACGAGCGGTTCCGATG Rev : GCCACAGGATTCCATACCCA	63	67	162	RTPrimerDB n°2847
Souris	TRPM8	NM_134252	For : TGTGCATCTACATGCTCTCCACCA Rev : GGGATGTTTAGGCGGTTGCAGTA	64	157	9188	Design personnel (PrimerQuest software)
Souris	TRPA1	NM_177781	For : CAGCCAAGGAGCAAATCCAAACCT Rev : GGACATCAAAGCCGTGTTCCCAT	64	160	4859	Design personnel (PrimerQuest software)
Souris	TREK-1	NM_010607	For : CCCAAGTCTGCTGCTCAGAACT Rev : ACGGTGGTTTTGAGGAGAAT	64	59	59	(Descoeur et al., 2011)
Souris	TRAAK	NM_008431	For : CTCTGGAGCAGCCTCACGA Rev : TCGGCATGATCCATTTTCT	64	53	53	(Descoeur et al., 2011)
Souris	Nav1.8	NM_009134	For : AACTTCGACAACGTTGCTATGGGC Rev : ACATGTACAGGCTCTCCTCCAAT	64	139	5034	Design personnel (PrimerQuest software)
Souris	Nav1.9	NM_011887	For : TTCCACTCTACGTACCTCCGAGT Rev : ATTCCCATGAAGAGCTGCTGACCA	63	180	3374	Design personnel (PrimerQuest software)
Souris	IL-6	NM_031168	For : ATGGATGCTACCAAACCTGGAT Rev : TGAAGGACTCTGGCTTTGTCT	62	139	3197	RTPrimerDB n°3654
Rat	Nav1.9	NM_019265	For : GCTTGGAGGACAGTGACATTTCTT Rev : CCAGCCTGAGGATTGCACCAA	60	84	84	(Berta et al., 2008)

Tableau 6. Amorces utilisées pour la qPCR.

Les couples référencé "RTPrimerDB" sont accessibles à l'adresse : <http://www.rtpimerdb.org>

Le logiciel PrimerQuest, facilitant le design de couples d'amorces, est mis à disposition par Integrated DNA Technologies à l'adresse <http://eu.idtdna.com/scitools/applications/primerquest/>

5. ELECTROPHYSIOLOGIE

Les expériences d'électrophysiologie sont réalisées au sein de l'UMR CNRS 6231 (équipe P Delmas) par François Maingret avec l'aide de Mélanie Gabriac.

Pour les expériences menées sur les modèles d'inflammation subaiguë et chronique, les neurones innervant spécifiquement la zone enflammée sont identifiés par une injection de marqueur rétrograde Dil (5 Probes). Le marqueur est injecté 3 jours avant prélèvement, au même site que l'injection de carragénine ou de CFA.

5.1. Culture primaire de neurones sensoriels

Les animaux sont sacrifiés par décapitation après anesthésie à l'isoflurane. Après prélèvement rapide, les DRG L4 à L6 sont incubés 45 min à 37°C dans une solution de collagénase IA à 2 mg/ml (Invitrogen) et dissociés par trituration mécanique dans du milieu de Hanks. Les neurones sont cultivés dans du milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur, 100 U/ml de pénicilline-streptomycine, 2 mM de L-glutamine, 25 ng/ml de NGF et 2 ng/ml de GDNF. Les cultures sont maintenues à 37°C en atmosphère humide (5% CO₂) pendant 3 à 6 h avant manipulations.

5.2. Patch clamp

Les expériences de patch clamp en cellule entière sont réalisées à température ambiante avec un amplificateur Axopatch 200B (Axon Instruments). Le signal est filtré à 2 kHz et enregistré à une fréquence de 20-50 kHz grâce au logiciel PCLAMP 8.02. Le courant de jonction est corrigé par un protocole P/6. Les erreurs de voltage sont réduites en compensant la résistance à 70-85%. Les pipettes de patch (1,9-2,5 MΩ) contiennent (en mM) : 100 CsCl, 30 CsF, 8 NaCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 acide éthylèneglycol-tétracétique (EGTA), 10 Acide 4-(2-HydroxyEthyl)-1-Pipérazine Ethane Sulfonique (Hepes), 4 MgATP, 0,4 Na₂GTP (pH 7,2, 300 mOsm/l). Le bain contient (en mM) : 60 NaCl, 110 sucrose, 3 KCl, 1 MgCl₂, 10 Hepes, 2,5 CaCl₂, 10 glucose, 10 triéthanolamine-Cl, 0,0005 TTX, 0,005 LaCl₃, 1 amiloride (pH 7,4, 305 mOsm/l). La boîte de culture est perfusée à un débit de 2,5 ml/min.

6. IMAGERIE METABOLIQUE

Les expériences d'imagerie métabolique ont été menées à l'UMR 990 INSERM/UdA par le Dr Elisabeth Miot-Noirault.

L'inflammation a été observée chez la souris monoarthritique 10 jours après induction par tomographie par émission de positons. Deux souris monoarthritiques ont reçu une injection intraveineuse de ¹⁸F-Fluorodésoxyglucose (Glucotep, Cyclopharma) à la dose de 10 MBq/animal. Après anesthésie par injection intrapéritonéale d'un mélange à 4 pour 1 de kétamine (Imalgene 500, Rhone Merieux) et de xylazine (Rompun, 2%, Bayer) à la dose de 20 µl / 10 g d'animal, elles sont placées dans le système d'acquisition (caméra TEP Explore Vista, logiciel MMKSVISTA, GE Healthcare). L'acquisition (durée de 15 min) est réalisée 40 min après anesthésie. La radioactivité détectée est normalisée par le poids de tissu contenu dans la région fixante (cette zone est définie au sein de chaque cheville). Ce calcul permet d'obtenir l'activité surfacique (en cpm/g) enregistrée dans chaque cheville. L'activité

surfacique de la cheville enflammée est enfin normalisée par l'activité enregistrée au niveau de la cheville controlatérale.

7. ANALYSES STATISTIQUES

En fonction du protocole expérimental, les données brutes sont analysées par :

- ANOVA une voie suivie d'un test de comparaisons multiples contre un groupe contrôle (Bonferroni)
- ANOVA deux voies suivie d'un test de comparaisons multiples deux-à-deux (Student-Newman-Keuls)
- Test non apparié de Student
- Test non paramétrique de Mann et Whitney

Par souci de clarté, le test statistique utilisé est indiqué dans la légende de chaque figure. Les analyses statistiques sont réalisées grâce au logiciel SigmaPlot 11.0. Toutes les valeurs sont présentées sous la forme de moyenne \pm erreur standard à la moyenne.

RÉFÉRENCES

1. **Abe M, Kurihara T, Han W, Shinomiya K, Tanabe T.** Changes in expression of voltage-dependent ion channel subunits in dorsal root ganglia of rats with radicular injury and pain. *Spine (Phila Pa 1976)* 27: 1517-24; discussion 1525, 2002.
2. **Abrahamsen B, Zhao J, Asante CO, Cendan CM, Marsh S, Martinez-Barbera JP, Nassar MA, Dickenson AH, Wood JN.** The cell and molecular basis of mechanical, cold, and inflammatory pain. *Science* 321: 702-705, 2008.
3. **Adelsberger H, Quasthoff S, Grosskreutz J, Lepier A, Eckel F, Lersch C.** The chemotherapeutic oxaliplatin alters voltage-gated Na(+) channel kinetics on rat sensory neurons. *Eur J Pharmacol* 406: 25-32, 2000.
4. **Akopian AN, Sivilotti L, Wood JN.** A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature* 379: 257-262, 1996.
5. **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.** The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. *Nat Neurosci* 2: 541-548, 1999.
6. **Ali BH.** Amelioration of oxaliplatin neurotoxicity by drugs in humans and experimental animals: a minireview of recent literature. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 106: 272-279, 2010.
7. **Alloui A, Zimmermann K, Mamet J, Duprat F, Noël J, Chemin J, Guy N, Blondeau N, Voilley N, Rubat-Coudert C, Borsotto M, Romey G, Heurteaux C, Reeh P, Eschalier A, Lazdunski M.** TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J* 25: 2368-2376, 2006.
8. **Amaya F, Decosterd I, Samad TA, Plumpton C, Tate S, Mannion RJ, Costigan M, Woolf CJ.** Diversity of expression of the sensory neuron-specific TTX-resistant voltage-gated sodium ion channels SNS and SNS2. *Mol Cell Neurosci* 15: 331-342, 2000.
9. **Amaya F, Wang H, Costigan M, Allchorne AJ, Hatcher JP, Egerton J, Stean T, Morisset V, Grose D, Gunthorpe MJ, Chessell IP, Tate S, Green PJ, Woolf CJ.** The voltage-gated sodium channel Na(v)1.9 is an effector of peripheral inflammatory pain hypersensitivity. *J Neurosci* 26: 12852-12860, 2006.
10. **Amir R, Argoff CE, Bennett GJ, Cummins TR, Durieux ME, Gerner P, Gold MS, Porreca F, Strichartz GR.** The role of sodium channels in chronic inflammatory and neuropathic pain. *J Pain* 7: S1-29, 2006.
11. **Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S.** Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci* 28: 2485-2494, 2008.
12. **Andratsch M, Mair N, Constantin CE, Scherbakov N, Benetti C, Quarta S, Vogl C, Sailer CA, Uceyler N, Brockhaus J, Martini R, Sommer C, Zeilhofer HU, Müller W, Kuner R, Davis JB, Rose-John S, Kress M.** A key role for gp130 expressed on peripheral sensory nerves in pathological pain. *J. Neurosci.* 29: 13473-13483, 2009.
13. **Ang WH, Myint M, Lippard SJ.** Transcription inhibition by platinum-DNA cross-links in live mammalian cells. *J Am Chem Soc* 132: 7429-7435, 2010.
14. **Argyriou AA, Polychronopoulos P, Iconomou G, Chroni E, Kalofonos HP.** A review on oxaliplatin-induced peripheral nerve damage. *Cancer Treat Rev* 34: 368-377, 2008.
15. **Attal N, Bouhassira D, Gautron M, Vaillant JN, Mitry E, Lepère C, Rougier P, Guirimand F.** Thermal hyperalgesia as a marker of oxaliplatin neurotoxicity: a prospective quantified sensory assessment study. *Pain* 144: 245-252, 2009.
16. **Babes A, Zorzon D, Reid G.** Two populations of cold-sensitive neurons in rat dorsal root ganglia and their modulation by nerve growth factor. *Eur J Neurosci* 20: 2276-2282, 2004.
17. **Baker MD, Chandra SY, Ding Y, Waxman SG, Wood JN.** GTP-induced tetrodotoxin-resistant Na⁺ current regulates excitability in mouse and rat small diameter sensory neurones. *J Physiol* 548: 373-382, 2003.
18. **Baker MD.** Protein kinase C mediates up-regulation of tetrodotoxin-resistant, persistent Na⁺ current in rat and mouse sensory neurones. *J Physiol* 567: 851-867, 2005.
19. **Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A.** Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 41: 849-857, 2004.
20. **Le Bars D, Adam F.** [Nociceptors and mediators in acute inflammatory pain]. *Ann Fr Anesth Reanim* 21: 315-335, 2002.

21. **Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D.** Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139: 267-284, 2009.
22. **Bautista DM, Jordt S-E, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI, Julius D.** TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124: 1269-1282, 2006.
23. **Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, Tsuruda PR, Basbaum AI, Stucky CL, Jordt S-E, Julius D.** The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* 448: 204-208, 2007.
24. **Belmonte C, Viana F.** Molecular and cellular limits to somatosensory specificity. *Mol Pain* 4, 2008.
25. **Benn SC, Costigan M, Tate S, Fitzgerald M, Woolf CJ.** Developmental expression of the TTX-resistant voltage-gated sodium channels Nav1.8 (SNS) and Nav1.9 (SNS2) in primary sensory neurons. *J Neurosci* 21: 6077-6085, 2001.
26. **Berta T, Poirot O, Pertin M, Ji R-R, Kellenberger S, Decosterd I.** Transcriptional and functional profiles of voltage-gated Na(+) channels in injured and non-injured DRG neurons in the SNI model of neuropathic pain. *Mol Cell Neurosci* 37: 196-208, 2008.
27. **Bird EV, Robinson PP, Boissonade FM.** Na(v)1.7 sodium channel expression in human lingual nerve neuromas. *Arch. Oral Biol.* 52: 494-502, 2007.
28. **Black J., Dib-Hajj S, McNabola K, Jeste S, Rizzo M., Kocsis J., Waxman S.** Spinal sensory neurons express multiple sodium channel α -subunit mRNAs. *Molecular Brain Research* 43: 117-131, 1996.
29. **Black JA, Liu S, Tanaka M, Cummins TR, Waxman SG.** Changes in the expression of tetrodotoxin-sensitive sodium channels within dorsal root ganglia neurons in inflammatory pain. *Pain* 108: 237-247, 2004.
30. **Black JA, Nikolajsen L, Kroner K, Jensen TS, Waxman SG.** Multiple sodium channel isoforms and mitogen-activated protein kinases are present in painful human neuromas. *Ann Neurol* 64: 644-653, 2008.
31. **Black JA, Renganathan M, Waxman SG.** Sodium channel Na(v)1.6 is expressed along nonmyelinated axons and it contributes to conduction. *Brain Res Mol Brain Res* 105: 19-28, 2002.
32. **Black JA, Waxman SG.** Molecular identities of two tetrodotoxin-resistant sodium channels in corneal axons. *Exp Eye Res* 75: 193-199, 2002.
33. **Blair NT, Bean BP.** Roles of tetrodotoxin (TTX)-sensitive Na⁺ current, TTX-resistant Na⁺ current, and Ca²⁺ current in the action potentials of nociceptive sensory neurons. *J Neurosci* 22: 10277-10290, 2002.
34. **Bölcskéi K, Helyes Z, Szabó A, Sándor K, Elekes K, Németh J, Almási R, Pintér E, Petho G, Szolcsányi J.** Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain* 117: 368-376, 2005.
35. **Boley SE, Wong VA, French JE, Recio L.** p53 heterozygosity alters the mRNA expression of p53 target genes in the bone marrow in response to inhaled benzene. *Toxicol Sci* 66: 209-215, 2002.
36. **Bosmans F, Puopolo M, Martin-Eauclaire M-F, Bean BP, Swartz KJ.** Functional properties and toxin pharmacology of a dorsal root ganglion sodium channel viewed through its voltage sensors. *J Gen Physiol* 138: 59-72, 2011.
37. **Bourinet E, Alloui A, Monteil A, Barrère C, Couette B, Poirot O, Pages A, McRory J, Snutch TP, Eschalier A, Nargeot J.** Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *EMBO J* 24: 315-324, 2005.
38. **Brackenburg WJ, Isom LL.** Voltage-gated Na⁺ channels: potential for beta subunits as therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets* 12: 1191-1203, 2008.
39. **Brackenburg WJ, Isom LL.** Na Channel β Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family. *Front Pharmacol* 2: 53, 2011.
40. **Brierley SM, Hughes PA, Page AJ, Kwan KY, Martin CM, O'Donnell TA, Cooper NJ, Harrington AM, Adam B, Liebrechts T, Holtmann G, Corey DP, Rychkov GY, Blackshaw LA.** The ion channel TRPA1 is required for normal mechanosensation and is modulated by algogenic stimuli. *Gastroenterology* 137: 2084-2095.e3, 2009.
41. **Burgess G, Williams D.** The discovery and development of analgesics: new mechanisms, new modalities. *J. Clin. Invest.* 120: 3753-3759, 2010.
42. **Burgess PR, Perl ER.** Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. *J Physiol* 190: 541-562, 1967.
43. **Burnstock G.** Purinergic P2 receptors as targets for novel analgesics. *Pharmacol. Ther.* 110: 433-454, 2006.
44. **Burnstock G.** Purinergic mechanosensory transduction and visceral pain. *Mol Pain* 5, 2009a.
45. **Burnstock G.** Purinergic receptors and pain. *Curr Pharm Des* 15: 1717-1735, 2009b.
46. **Cahusac PMB, Noyce R.** A pharmacological study of slowly adapting mechanoreceptors responsive to cold thermal stimulation. *Neuroscience* 148: 489-500, 2007.

47. **Calvino B, Grilo RM.** Central pain control. *Joint Bone Spine* 73: 10-16, 2006.
48. **Camilleri M.** Review article: new receptor targets for medical therapy in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 31: 35-46, 2010.
49. **del Camino D, Murphy S, Heiry M, Barrett LB, Earley TJ, Cook CA, Petrus MJ, Zhao M, D'Amours M, Deering N, Brenner GJ, Costigan M, Hayward NJ, Chong JA, Fanger CM, Woolf CJ, Patapoutian A, Moran MM.** TRPA1 contributes to cold hypersensitivity. *J Neurosci* 30: 15165-15174, 2010.
50. **Cardenas CA, Cardenas CG, de Armendi AJ, Scroggs RS.** Carbamazepine interacts with a slow inactivation state of Nav1.8-like sodium channels. *Neurosci. Lett.* 408: 129-134, 2006.
51. **Carlton SM, Hargett GL.** Colocalization of metabotropic glutamate receptors in rat dorsal root ganglion cells. *J. Comp. Neurol.* 501: 780-789, 2007.
52. **Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D.** Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288: 306-313, 2000.
53. **Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D.** A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398: 436-441, 1999.
54. **Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D.** The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-824, 1997.
55. **Catterall WA, Cest le S, Yarov-Yarovoy V, Yu FH, Konoki K, Scheuer T.** Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon* 49: 124-141, 2007.
56. **Catterall WA.** From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26: 13-25, 2000.
57. **Chambers JC, Zhao J, Terracciano CMN, Bezzina CR, Zhang W, Kaba R, Navaratnarajah M, Lotlikar A, Sehmi JS, Kooner MK, Deng G, Siedlecka U, Parasramka S, El-Hamamsy I, Wass MN, Dekker LRC, de Jong JSSG, Sternberg MJE, McKenna W, Severs NJ, de Silva R, Wilde AAM, Anand P, Yacoub M, Scott J, Elliott P, Wood JN, Kooner JS.** Genetic variation in SCN10A influences cardiac conduction. *Nat. Genet.* 42: 149-152, 2010.
58. **Chillingworth NL, Donaldson LF.** Characterisation of a Freund's complete adjuvant-induced model of chronic arthritis in mice. *J Neurosci Methods* 128: 45-52, 2003.
59. **Coggeshall RE, Tate S, Carlton SM.** Differential expression of tetrodotoxin-resistant sodium channels Nav1.8 and Nav1.9 in normal and inflamed rats. *Neurosci Lett* 355: 45-48, 2004.
60. **Colburn RW, Lubin ML, Stone DJ, Wang Y, Lawrence D, D'Andrea MR, Brandt MR, Liu Y, Flores CM, Qin N.** Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron* 54: 379-386, 2007.
61. **Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A.** Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* 330: 55-60, 2010.
62. **Coste B, Osorio N, Padilla F, Crest M, Delmas P.** Gating and modulation of presumptive Nav1.9 channels in enteric and spinal sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* 26: 123-134, 2004.
63. **Costigan M, Woolf CJ.** Pain: molecular mechanisms. *J Pain* 1: 35-44, 2000.
64. **Coward K, Plumpton C, Facer P, Birch R, Carlstedt T, Tate S, Bountra C, Anand P.** Immunolocalization of SNS/PN3 and NaN/SNS2 sodium channels in human pain states. *Pain* 85: 41-50, 2000.
65. **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.** An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* 444: 894-898, 2006.
66. **Cummins TR, Aglieco F, Renganathan M, Herzog RI, Dib-Hajj SD, Waxman SG.** Nav1.3 sodium channels: rapid repriming and slow closed-state inactivation display quantitative differences after expression in a mammalian cell line and in spinal sensory neurons. *J. Neurosci.* 21: 5952-5961, 2001.
67. **Cummins TR, Black JA, Dib-Hajj SD, Waxman SG.** Glial-derived neurotrophic factor upregulates expression of functional SNS and NaN sodium channels and their currents in axotomized dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 20: 8754-8761, 2000.
68. **Cummins TR, Dib-Hajj SD, Black JA, Akopian AN, Wood JN, Waxman SG.** A novel persistent tetrodotoxin-resistant sodium current in SNS-null and wild-type small primary sensory neurons. *J. Neurosci.* 19: RC43, 1999.
69. **Cummins TR, Sheets PL, Waxman SG.** The roles of sodium channels in nociception: Implications for mechanisms of pain. *Pain* 131: 243-257, 2007.
70. **Dallel R, Villanueva L, Woda A, Voisin D.** [Neurobiology of trigeminal pain]. *Med Sci (Paris)* 19: 567-574, 2003.

71. **Darian-Smith I, Johnson KO, LaMotte C, Shigenaga Y, Kenins P, Champness P.** Warm fibers innervating palmar and digital skin of the monkey: responses to thermal stimuli. *J Neurophysiol* 42: 1297-1315, 1979.
72. **Davies SL, Loescher AR, Clayton NM, Bountra C, Robinson PP, Boissonade FM.** Changes in sodium channel expression following trigeminal nerve injury. *Exp Neurol* 202: 207-216, 2006.
73. **Davis KD, Meyer RA, Campbell JN.** Chemosensitivity and sensitization of nociceptive afferents that innervate the hairy skin of monkey. *J Neurophysiol* 69: 1071-1081, 1993.
74. **Davis KD, Pope GE.** Noxious cold evokes multiple sensations with distinct time courses. *Pain* 98: 179-185, 2002.
75. **Decosterd I, Ji R-R, Abdi S, Tate S, Woolf CJ.** The pattern of expression of the voltage-gated sodium channels Na(v)1.8 and Na(v)1.9 does not change in uninjured primary sensory neurons in experimental neuropathic pain models. *Pain* 96: 269-277, 2002.
76. **Descoeur J, Pereira V, Pizzoccaro A, Francois A, Ling B, Maffre V, Couette B, Busserolles J, Courteix C, Noel J, Lazdunski M, Eschalier A, Authier N, Bourinet E.** Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. *EMBO Mol Med* 3: 266-278, 2011.
77. **Devor M.** Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. *Pain Suppl* 6: S27-S35, 1999.
78. **Dhaka A, Murray AN, Mathur J, Earley TJ, Petrus MJ, Patapoutian A.** TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron* 54: 371-378, 2007.
79. **Dib-Hajj S, Black JA, Felts P, Waxman SG.** Down-regulation of transcripts for Na channel alpha-SNS in spinal sensory neurons following axotomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 14950-14954, 1996.
80. **Dib-Hajj SD, Cummins TR, Black JA, Waxman SG.** From genes to pain: Na v 1.7 and human pain disorders. *Trends Neurosci* 30: 555-563, 2007.
81. **Dib-Hajj SD, Cummins TR, Black JA, Waxman SG.** Sodium channels in normal and pathological pain. *Annu Rev Neurosci* 33: 325-347, 2010.
82. **Dib-Hajj SD, Tyrrell L, Black JA, Waxman SG.** NaN, a novel voltage-gated Na channel, is expressed preferentially in peripheral sensory neurons and down-regulated after axotomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8963-8968, 1998.
83. **Dib-Hajj SD, Tyrrell L, Cummins TR, Black JA, Wood PM, Waxman SG.** Two tetrodotoxin-resistant sodium channels in human dorsal root ganglion neurons. *FEBS Lett* 462: 117-120, 1999.
84. **Dib-Hajj SD, Tyrrell L, Waxman SG.** Structure of the sodium channel gene SCN11A: evidence for intron-to-exon conversion model and implications for gene evolution. *Mol Neurobiol* 26: 235-250, 2002.
85. **Dichgans M, Freilinger T, Eckstein G, Babini E, Lorenz-Depiereux B, Biskup S, Ferrari MD, Herzog J, van den Maagdenberg AMJM, Pusch M, Strom TM.** Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine. *Lancet* 366: 371-377, 2005.
86. **Dirajlal S, Pauers LE, Stucky CL.** Differential response properties of IB(4)-positive and -negative unmyelinated sensory neurons to protons and capsaicin. *J Neurophysiol* 89: 513-524, 2003.
87. **Djouhri L, Lawson SN.** Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res Brain Res Rev* 46: 131-145, 2004.
88. **Dubner R, Sumino R, Wood WI.** A peripheral « cold » fiber population responsive to innocuous and noxious thermal stimuli applied to monkey's face. *J Neurophysiol* 38: 1373-1389, 1975.
89. **Dubreuil A-S, Boukhaddaoui H, Desmadryl G, Martinez-Salgado C, Moshourab R, Lewin GR, Carroll P, Valmier J, Scamps F.** Role of T-type calcium current in identified D-hair mechanoreceptor neurons studied in vitro. *J Neurosci* 24: 8480-8484, 2004.
90. **Egashira N, Hirakawa S, Kawashiri T, Yano T, Ikesue H, Oishi R.** Mexiletine reverses oxaliplatin-induced neuropathic pain in rats. *J Pharmacol Sci* 112: 473-476, 2010.
91. **Ekberg J, Adams DJ.** Neuronal voltage-gated sodium channel subtypes: key roles in inflammatory and neuropathic pain. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 2005-2010, 2006.
92. **Eliav E, Benoliel R, Herzberg U, Kalladka M, Tal M.** The role of IL-6 and IL-1beta in painful perineural inflammatory neuritis. *Brain Behav. Immun.* 23: 474-484, 2009.
93. **England S, Bevan S, Docherty RJ.** PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J Physiol* 495 (Pt 2): 429-440, 1996.
94. **Everaerts W, Gees M, Alpizar YA, Farre R, Leten C, Apetrei A, Dewachter I, van Leuven F, Vennekens R, De Ridder D, Nilius B, Voets T, Talavera K.** The capsaicin receptor TRPV1 is a crucial mediator of the noxious effects of mustard oil. *Curr. Biol.* 21: 316-321, 2011.

95. **Fang X, Djouhri L, Black JA, Dib-Hajj SD, Waxman SG, Lawson SN.** The presence and role of the tetrodotoxin-resistant sodium channel Na(v)1.9 (NaN) in nociceptive primary afferent neurons. *J Neurosci* 22: 7425-7433, 2002.
96. **Fathi H B, Rowan EG, Harvey AL.** The facilitatory actions of snake venom phospholipase A(2) neurotoxins at the neuromuscular junction are not mediated through voltage-gated K(+) channels. *Toxicon* 39: 1871-1882, 2001.
97. **Fjell J, Cummins TR, Dib-Hajj SD, Fried K, Black JA, Waxman SG.** Differential role of GDNF and NGF in the maintenance of two TTX-resistant sodium channels in adult DRG neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 67: 267-282, 1999.
98. **Fukuoka T, Kobayashi K, Yamanaka H, Obata K, Dai Y, Noguchi K.** Comparative study of the distribution of the alpha-subunits of voltage-gated sodium channels in normal and axotomized rat dorsal root ganglion neurons. *J Comp Neurol* 510: 188-206, 2008.
99. **Gamelin L, Boisdron-Celle M, Delva R, Guérin-Meyer V, Ifrah N, Morel A, Gamelin E.** Prevention of oxaliplatin-related neurotoxicity by calcium and magnesium infusions: a retrospective study of 161 patients receiving oxaliplatin combined with 5-Fluorouracil and leucovorin for advanced colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 10: 4055-4061, 2004.
100. **Gamelin L, Boisdron-Celle M, Morel A, Gamelin E.** [Oxaliplatin neurotoxicity]. *Bull Cancer* 93 Suppl 1: S17-S22, 2006.
101. **Gamelin L, Capitain O, Morel A, Dumont A, Traore S, Anne LB, Gilles S, Boisdron-Celle M, Gamelin E.** Predictive factors of oxaliplatin neurotoxicity: the involvement of the oxalate outcome pathway. *Clin Cancer Res* 13: 6359-6368, 2007.
102. **García KD, Sprunger LK, Meisler MH, Beam KG.** The sodium channel Scn8a is the major contributor to the postnatal developmental increase of sodium current density in spinal motoneurons. *J Neurosci* 18: 5234-5239, 1998.
103. **Gasser HS, Hartree W.** The inseparability of the mechanical and thermal responses in muscle. *J Physiol* 58: 396-404, 1924.
104. **Gasser HS.** The classification of nerve fibers. *Ohio J Sci* 41: 145-159, 1941.
105. **Gauchan P, Andoh T, Kato A, Kuraishi Y.** Involvement of increased expression of transient receptor potential melastatin 8 in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. *Neurosci Lett* 458: 93-95, 2009.
106. **Gentry C, Stoakley N, Andersson DA, Bevan S.** The roles of iPLA2, TRPM8 and TRPA1 in chemically induced cold hypersensitivity. *Mol Pain* 6, 2010.
107. **George AL.** Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *J Clin Invest* 115: 1990-1999, 2005.
108. **Gerke MB, Plenderleith MB.** Binding sites for the plant lectin *Bandeiraea simplicifolia* I-isolectin B(4) are expressed by nociceptive primary sensory neurones. *Brain Res* 911: 101-104, 2001.
109. **Gold MS, Caterina MJ.** 5.04 - Molecular Biology of the Nociceptor/Transduction. Dans: *The Senses: A Comprehensive Reference*. Academic Press, 2008, p. 43 -73.
110. **Gold MS, Gebhart GF.** Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat Med* 16: 1248-1257, 2010.
111. **Gold MS, Levine JD, Correa AM.** Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. *J Neurosci* 18: 10345-10355, 1998.
112. **Gold MS, Reichling DB, Shuster MJ, Levine JD.** Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na+ current in nociceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 1108-1112, 1996.
113. **Gold MS, Weinreich D, Kim C-S, Wang R, Treanor J, Porreca F, Lai J.** Redistribution of Na(V)1.8 in uninjured axons enables neuropathic pain. *J. Neurosci.* 23: 158-166, 2003.
114. **de Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, Boni C, Cortes-Funes H, Cervantes A, Freyer G, Papamichael D, Bail NL, Louvet C, Hendler D, de Braud F, Wilson C, Morvan F, Bonetti A.** Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 18: 2938-2947, 2000.
115. **Guirimand F, Le Bars D.** [Physiology of nociception]. *Ann Fr Anesth Reanim* 15: 1048-1079, 1996.
116. **Güler AD, Lee H, Iida T, Shimizu I, Tominaga M, Caterina M.** Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci* 22: 6408-6414, 2002.
117. **Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X, Elde R.** Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur J Neurosci* 11: 946-958, 1999.
118. **Hains BC, Klein JP, Saab CY, Craner MJ, Black JA, Waxman SG.** Upregulation of sodium channel Nav1.3 and functional involvement in neuronal hyperexcitability associated with central neuropathic pain after spinal cord injury. *J Neurosci* 23: 8881-8892, 2003.

Références

119. He X-H, Zang Y, Chen X, Pang R-P, Xu J-T, Zhou X, Wei X-H, Li Y-Y, Xin W-J, Qin Z-H, Liu X-G. TNF- α contributes to up-regulation of Nav1.3 and Nav1.8 in DRG neurons following motor fiber injury. *Pain* 151: 266-279, 2010.
120. Herzog RI, Cummins TR, Ghassemi F, Dib-Hajj SD, Waxman SG. Distinct repriming and closed-state inactivation kinetics of Nav1.6 and Nav1.7 sodium channels in mouse spinal sensory neurons. *J. Physiol. (Lond.)* 551: 741-750, 2003.
121. Herzog RI, Cummins TR, Waxman SG. Persistent TTX-resistant Na⁺ current affects resting potential and response to depolarization in simulated spinal sensory neurons. *J Neurophysiol* 86: 1351-1364, 2001.
122. Holzer AK, Manorek GH, Howell SB. Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Mol Pharmacol* 70: 1390-1394, 2006.
123. Hong S, Morrow TJ, Paulson PE, Isom LL, Wiley JW. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in tetrodotoxin-sensitive and -resistant sodium channels in dorsal root ganglion neurons in the rat. *J Biol Chem* 279: 29341-29350, 2004.
124. Hong S, Wiley JW. Altered expression and function of sodium channels in large DRG neurons and myelinated A-fibers in early diabetic neuropathy in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 339: 652-660, 2006.
125. Huang SM, Li X, Yu Y, Wang J, Caterina MJ. TRPV3 and TRPV4 ion channels are not major contributors to mouse heat sensation. *Mol Pain* 7, 2011.
126. Irmiler IM, Opfermann T, Gebhardt P, Gajda M, Bräuer R, Saluz HP, Kamradt T. In vivo molecular imaging of experimental joint inflammation by combined (18)F-FDG positron emission tomography and computed tomography. *Arthritis Res. Ther.* 12: R203, 2010.
127. Jarvis MF, Honore P, Shieh C-C, Chapman M, Joshi S, Zhang X-F, 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, Krafft DS. 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: 8520-8525, 2007.
128. Ji R-R, Samad TA, Jin S-X, Schmall R, Woolf CJ. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron* 36: 57-68, 2002.
129. Jin X, Gereau R. Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor- α . *J. Neurosci.* 26: 246-255, 2006.
130. Jordt S-E, Bautista DM, Chuang H-H, McKemy DD, Zygmunt PM, Högestätt ED, Meng ID, Julius D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427: 260-265, 2004.
131. Joseph EK, Chen X, Bogen O, Levine JD. Oxaliplatin acts on IB4-positive nociceptors to induce an oxidative stress-dependent acute painful peripheral neuropathy. *J Pain* 9: 463-472, 2008.
132. Joshi SK, Mikusa JP, Hernandez G, Baker S, Shieh C-C, Neelands T, Zhang X-F, Niforatos W, Kage K, Han P, Krafft D, Faltynek C, Sullivan JP, Jarvis MF, Honore P. Involvement of the TTX-resistant sodium channel Nav 1.8 in inflammatory and neuropathic, but not post-operative, pain states. *Pain* 123: 75-82, 2006.
133. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413: 203-210, 2001.
134. Kadl A, Huber J, Gruber F, Bochkov VN, Binder BR, Leitinger N. Analysis of inflammatory gene induction by oxidized phospholipids in vivo by quantitative real-time RT-PCR in comparison with effects of LPS. *Vascul Pharmacol* 38: 219-227, 2002.
135. Kang D, Choe C, Kim D. Thermosensitivity of the two-pore domain K⁺ channels TREK-2 and TRAAK. *J Physiol* 564: 103-116, 2005.
136. Kang D, Kim D. TREK-2 (K2P10.1) and TRESK (K2P18.1) are major background K⁺ channels in dorsal root ganglion neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* 291: C138-C146, 2006.
137. Kang K, Pulver SR, Panzano VC, Chang EC, Griffith LC, Theobald DL, Garrity PA. Analysis of Drosophila TRPA1 reveals an ancient origin for human chemical nociception. *Nature* 464: 597-600, 2010.
138. Karashima Y, Damann N, Prenen J, Talavera K, Segal A, Voets T, Nilius B. Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1. *J. Neurosci.* 27: 9874-9884, 2007.
139. Karashima Y, Talavera K, Everaerts W, Janssens A, Kwan KY, Vennekens R, Nilius B, Voets T. TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1273-1278, 2009.
140. Kerr BJ, Souslova V, McMahon SB, Wood JN. A role for the TTX-resistant sodium channel Nav 1.8 in NGF-induced hyperalgesia, but not neuropathic pain. *Neuroreport* 12: 3077-3080, 2001.
141. Kiernan MC. The pain with platinum: Oxaliplatin and neuropathy. *Eur J Cancer* 43: 2631-2633, 2007.

142. **Kim CH, Oh Y, Chung JM, Chung K.** The changes in expression of three subtypes of TTX sensitive sodium channels in sensory neurons after spinal nerve ligation. *Brain Res Mol Brain Res* 95: 153-161, 2001.
143. **Kim CH, Oh Y, Chung JM, Chung K.** Changes in three subtypes of tetrodotoxin sensitive sodium channel expression in the axotomized dorsal root ganglion in the rat. *Neurosci. Lett.* 323: 125-128, 2002.
144. **Kim YS, Son JY, Kim TH, Paik SK, Dai Y, Noguchi K, Ahn DK, Bae YC.** Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in the rat trigeminal sensory afferents and spinal dorsal horn. *J Comp Neurol* 518: 687-698, 2010.
145. **King DE, Macleod RJ, Vanner SJ.** Trinitrobenzenesulphonic acid colitis alters Na 1.8 channel expression in mouse dorsal root ganglia neurons. *Neurogastroenterol Motil* 21: 880-e64, 2009.
146. **Knowlton WM, Bifolck-Fisher A, Bautista DM, McKemy DD.** TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics in vivo. *Pain* 150: 340-350, 2010.
147. **Knowlton WM, Daniels RL, Palkar R, McCoy DD, McKemy DD.** Pharmacological Blockade of TRPM8 Ion Channels Alters Cold and Cold Pain Responses in Mice. *PLoS ONE* 6: e25894, 2011.
148. **Kobayashi K, Fukuoka T, Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Tokunaga A, Noguchi K.** Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with adelta/c-fibers and colocalization with trk receptors. *J Comp Neurol* 493: 596-606, 2005.
149. **Koesling D, Russwurm M, Mergia E, Mullershausen F, Friebe A.** Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase: structure and regulation. *Neurochem. Int.* 45: 813-819, 2004.
150. **Koltzenburg M, Stucky CL, Lewin GR.** Receptive properties of mouse sensory neurons innervating hairy skin. *J Neurophysiol* 78: 1841-1850, 1997.
151. **Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang D-S, Woolf CJ, Corey DP.** TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* 50: 277-289, 2006.
152. **Kwan KY, Glazer JM, Corey DP, Rice FL, Stucky CL.** TRPA1 modulates mechanotransduction in cutaneous sensory neurons. *J Neurosci* 29: 4808-4819, 2009.
153. **Lai J, Gold MS, Kim CS, Bian D, Ossipov MH, Hunter JC, Porreca F.** Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, Nav1.8. *Pain* 95: 143-152, 2002.
154. **LaMotte RH, Thalhammer JG.** Response properties of high-threshold cutaneous cold receptors in the primate. *Brain Res* 244: 279-287, 1982.
155. **Land SR, Kopec JA, Cecchini RS, Ganz PA, Wieand HS, Colangelo LH, Murphy K, Kuebler JP, Seay TE, Needles BM, Bearden JD, Colman LK, Lanier KS, Pajon ER, Cella D, Smith RE, O'Connell MJ, Costantino JP, Wolmark N.** Neurotoxicity from oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: NSABP C-07. *J Clin Oncol* 25: 2205-2211, 2007.
156. **Latorre R, Brauchi S, Orta G, Zaelzer C, Vargas G.** ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell Calcium* 42: 427-438, 2007.
157. **Lawson SN, Crepps B, Perl ER.** Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity and afferent receptive properties of dorsal root ganglion neurones in guinea-pigs. *J Physiol* 540: 989-1002, 2002.
158. **Lee S-Y, Lee J-H, Kang KK, Hwang S-Y, Choi KD, Oh U.** Sensitization of vanilloid receptor involves an increase in the phosphorylated form of the channel. *Arch. Pharm. Res.* 28: 405-412, 2005.
159. **Lehky TJ, Leonard GD, Wilson RH, Grem JL, Floeter MK.** Oxaliplatin-induced neurotoxicity: acute hyperexcitability and chronic neuropathy. *Muscle Nerve* 29: 387-392, 2004.
160. **Leo S, D'Hooge R, Meert T.** Exploring the role of nociceptor-specific sodium channels in pain transmission using Nav1.8 and Nav1.9 knockout mice. *Behav Brain Res* 208: 149-157, 2010.
161. **Levy D, Strassman A.** Modulation of dural nociceptor mechanosensitivity by the nitric oxide-cyclic GMP signaling cascade. *J. Neurophysiol.* 92: 766-772, 2004.
162. **Lindia JA, Köhler MG, Martin WJ, Abbadie C.** Relationship between sodium channel Nav1.3 expression and neuropathic pain behavior in rats. *Pain* 117: 145-153, 2005.
163. **Ling B, Authier N, Balayssac D, Eschalier A, Coudore F.** Behavioral and pharmacological description of oxaliplatin-induced painful neuropathy in rat. *Pain* 128: 225-234, 2007a.
164. **Ling B, Coudoré-Civiale M-A, Balayssac D, Eschalier A, Coudoré F, Authier N.** Behavioral and immunohistological assessment of painful neuropathy induced by a single oxaliplatin injection in the rat. *Toxicology* 234: 176-184, 2007b.
165. **Lolignier S, Amsalem M, Maingret F, Padilla F, Gabriac M, Chapuy E, Eschalier A, Delmas P, Busserolles J.** Nav1.9 channel contributes to mechanical and heat pain hypersensitivity induced by subacute and chronic inflammation. *PLoS One* 6, 2011.

166. **Lynn B.** « Silent » nociceptors in the skin. *Trends Neurosci* 14, 1991.
167. **Madrid R, de la Peña E, Donovan-Rodriguez T, Belmonte C, Viana F.** Variable threshold of trigeminal cold-thermosensitive neurons is determined by a balance between TRPM8 and Kv1 potassium channels. *J. Neurosci.* 29: 3120-3131, 2009.
168. **Maingret F, Coste B, Padilla F, Clerc N, Crest M, Korogod SM, Delmas P.** Inflammatory mediators increase Nav1.9 current and excitability in nociceptors through a coincident detection mechanism. *J Gen Physiol* 131: 211-225, 2008.
169. **Maingret F, Fosset M, Lesage F, Lazdunski M, Honoré E.** TRAAK is a mammalian neuronal mechano-gated K⁺ channel. *J Biol Chem* 274: 1381-1387, 1999a.
170. **Maingret F, Lauritzen I, Patel AJ, Heurteaux C, Reyes R, Lesage F, Lazdunski M, Honoré E.** TREK-1 is a heat-activated background K⁽⁺⁾ channel. *EMBO J* 19: 2483-2491, 2000.
171. **Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M, Honoré E.** Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *J Biol Chem* 274: 26691-26696, 1999b.
172. **Maroto R, Raso A, Wood TG, Kurosky A, Martinac B, Hamill OP.** TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat Cell Biol* 7: 179-185, 2005.
173. **Martin HA, Basbaum AI, Kwiat GC, Goetzl EJ, Levine JD.** Leukotriene and prostaglandin sensitization of cutaneous high-threshold C- and A-delta mechanonociceptors in the hairy skin of rat hindlimbs. *Neuroscience* 22: 651-659, 1987.
174. **Martinez V, Melgar S.** Lack of colonic-inflammation-induced acute visceral hypersensitivity to colorectal distension in Na(v)1.9 knockout mice. *Eur J Pain* 12: 934-944, 2008.
175. **Maruyama H, Yamamoto M, Matsutomi T, Zheng T, Nakata Y, Wood JN, Ogata N.** Electrophysiological characterization of the tetrodotoxin-resistant Na⁺ channel, Na(v)1.9, in mouse dorsal root ganglion neurons. *Pflugers Arch* 449: 76-87, 2004.
176. **Matsui T, Nakata N, Nagai S, Nakatani A, Takahashi M, Momose T, Ohtomo K, Koyasu S.** Inflammatory cytokines and hypoxia contribute to 18F-FDG uptake by cells involved in pannus formation in rheumatoid arthritis. *J. Nucl. Med.* 50: 920-926, 2009.
177. **McGaraughty S, Wismer CT, Zhu CZ, Mikusa J, Honore P, Chu KL, Lee C-H, Faltynek CR, Jarvis MF.** Effects of A-317491, a novel and selective P2X3/P2X2/3 receptor antagonist, on neuropathic, inflammatory and chemogenic nociception following intrathecal and intraplantar administration. *Br J Pharmacol* 140: 1381-1388, 2003.
178. **McGlone F, Reilly D.** The cutaneous sensory system. *Neurosci Biobehav Rev* 34: 148-159, 2010.
179. **McKemy DD, Neuhausser WM, Julius D.** Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416: 52-58, 2002.
180. **McKemy DD.** How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in the molecular logic of cold sensation. *Mol Pain* 1, 2005.
181. **McMahon SB, Armanini MP, Ling LH, Phillips HS.** Expression and coexpression of Trk receptors in subpopulations of adult primary sensory neurons projecting to identified peripheral targets. *Neuron* 12: 1161-1171, 1994.
182. **Melzack R, Wall PD.** Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150: 971-979, 1965.
183. **Mestre C, Pélissier T, Fialip J, Wilcox G, Eschalier A.** A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 32: 197-200, 1994.
184. **Meyer RA, Ringkamp M, Campbell JN, Raja SN.** *Peripheral mechanisms of cutaneous nociception.* In *Wall and Melzack's Textbook of Pain.* Philadelphia: Elsevier, 2008.
185. **Millan MJ.** The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57: 1-164, 1999.
186. **Millan MJ.** Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66: 355-474, 2002.
187. **Misra SN, Kahlig KM, George AL Jr.** Impaired Nav1.2 function and reduced cell surface expression in benign familial neonatal-infantile seizures. *Epilepsia* 49: 1535-1545, 2008.
188. **Miyamoto T, Dubin AE, Petrus MJ, Patapoutian A.** TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. *PLoS ONE* 4: e7596, 2009.
189. **Mizushima T, Obata K, Katsura H, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Fukuoka T, Tokunaga A, Mashimo T, Noguchi K.** Noxious cold stimulation induces mitogen-activated protein kinase activation in transient receptor potential (TRP) channels TRPA1- and TRPM8-containing small sensory neurons. *Neuroscience* 140: 1337-1348, 2006.
190. **Molliver DC, Wright DE, Leitner ML, Parsadanian AS, Doster K, Wen D, Yan Q, Snider WD.** IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. *Neuron* 19: 849-861, 1997.
191. **Moqrich A, Hwang SW, Earley TJ, Petrus MJ, Murray AN, Spencer KSR, Andahazy M, Story GM, Patapoutian A.** Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* 307: 1468-1472, 2005.

192. **Munns C, AlQatari M, Koltzenburg M.** Many cold sensitive peripheral neurons of the mouse do not express TRPM8 or TRPA1. *Cell Calcium* 41: 331-342, 2007.
193. **Nagata K, Duggan A, Kumar G, García-Añoveros J.** Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J Neurosci* 25: 4052-4061, 2005.
194. **Nassar MA, Baker MD, Levato A, Ingram R, Mallucci G, McMahon SB, Wood JN.** Nerve injury induces robust allodynia and ectopic discharges in Nav1.3 null mutant mice. *Mol Pain* 2, 2006.
195. **Nassar MA, Levato A, Stirling LC, Wood JN.** Neuropathic pain develops normally in mice lacking both Na(v)1.7 and Na(v)1.8. *Mol Pain* 1: 24, 2005.
196. **Nassar MA, Stirling LC, Forlani G, Baker MD, Matthews EA, Dickenson AH, Wood JN.** 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: 12706-12711, 2004.
197. **Nassini R, Gees M, Harrison S, De Siena G, Materazzi S, Moretto N, Failli P, Preti D, Marchetti N, Cavazzini A, Mancini F, Pedretti P, Nilius B, Patacchini R, Geppetti P.** Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation. *PAIN* 152: 1621-1631, 2011.
198. **Noël J, Zimmermann K, Busserolles J, Deval E, Alloui A, Diochot S, Guy N, Borsotto M, Reeh P, Eschalièr A, Lazdunski M.** The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J* 28: 1308-1318, 2009.
199. **Obreja O, Rathee PK, Lips KS, Distler C, Kress M.** IL-1 beta potentiates heat-activated currents in rat sensory neurons: involvement of IL-1RI, tyrosine kinase, and protein kinase C. *FASEB J.* 16: 1497-1503, 2002.
200. **Ogata N, Ohishi Y.** Molecular diversity of structure and function of the voltage-gated Na⁺ channels. *Jpn J Pharmacol* 88: 365-377, 2002.
201. **Okamura Y, Nishino A, Murata Y, Nakajo K, Iwasaki H, Ohtsuka Y, Tanaka-Kunishima M, Takahashi N, Hara Y, Yoshida T, Nishida M, Okado H, Watari H, Meinertzhagen IA, Satoh N, Takahashi K, Satou Y, Okada Y, Mori Y.** Comprehensive analysis of the ascidian genome reveals novel insights into the molecular evolution of ion channel genes. *Physiol Genomics* 22: 269-282, 2005.
202. **Okazawa M, Inoue W, Hori A, Hosokawa H, Matsumura K, Kobayashi S.** Noxious heat receptors present in cold-sensory cells in rats. *Neurosci Lett* 359: 33-36, 2004.
203. **Olausson H, Lamarre Y, Backlund H, Morin C, Wallin BG, Starck G, Ekholm S, Strigo I, Worsley K, Vallbo AB, Bushnell MC.** Unmyelinated tactile afferents signal touch and project to insular cortex. *Nat Neurosci* 5: 900-904, 2002.
204. **Ostman JAR, Nassar MA, Wood JN, Baker MD.** GTP up-regulated persistent Na⁺ current and enhanced nociceptor excitability require Nav1.9. *J Physiol* 586: 1077-1087, 2008.
205. **Ozaktay AC, Cavanaugh JM, Asik I, DeLeo JA, Weinstein JN.** Dorsal root sensitivity to interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor in rats. *Eur Spine J* 11: 467-475, 2002.
206. **Padilla F, Couble M-L, Coste B, Maingret F, Clerc N, Crest M, Ritter AM, Magloire H, Delmas P.** Expression and localization of the Nav1.9 sodium channel in enteric neurons and in trigeminal sensory endings: implication for intestinal reflex function and orofacial pain. *Mol Cell Neurosci* 35: 138-152, 2007.
207. **Page AJ, Brierley SM, Martin CM, Price MP, Symonds E, Butler R, Wemmie JA, Blackshaw LA.** Different contributions of ASIC channels 1a, 2, and 3 in gastrointestinal mechanosensory function. *Gut* 54: 1408-1415, 2005.
208. **Park SB, Goldstein D, Lin CS-Y, Krishnan AV, Friedlander ML, Kiernan MC.** Acute abnormalities of sensory nerve function associated with oxaliplatin-induced neurotoxicity. *J Clin Oncol* 27: 1243-1249, 2009.
209. **Park SB, Lin CS-Y, Krishnan AV, Goldstein D, Friedlander ML, Kiernan MC.** Dose effects of oxaliplatin on persistent and transient Na⁺ conductances and the development of neurotoxicity. *PLoS One* 6, 2011.
210. **Patapoutian A, Peier AM, Story GM, Viswanath V.** ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci* 4: 529-539, 2003.
211. **Patel AJ, Honoré E.** Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels. *Trends Neurosci* 24: 339-346, 2001.
212. **Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A.** A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108: 705-715, 2002a.
213. **Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A.** A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108: 705-715, 2002b.
214. **Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, Moqrich A, Earley TJ, Hergarden AC, Story GM, Colley S, Hogenesch JB, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A.** A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* 296: 2046-2049, 2002c.

215. **Peng YB, Ringkamp M, Meyer RA, Campbell JN.** Fatigue and paradoxical enhancement of heat response in C-fiber nociceptors from cross-modal excitation. *J Neurosci* 23: 4766-4774, 2003.
216. **Perlewitz A, Nafz B, Skalweit A, Föhling M, Persson PB, Thiele B-J.** Aldosterone and vasopressin affect alpha- and gamma-ENaC mRNA translation. *Nucleic Acids Res* 38: 5746-5760, 2010.
217. **Persson A-K, Black JA, Gasser A, Fischer T, Waxman SG.** Sodium-calcium exchanger and multiple sodium channel isoforms in intra-epidermal nerve terminals. *Mol Pain* 6, 2010.
218. **Pertin M, Ji R-R, Berta T, Powell AJ, Karchewski L, Tate SN, Isom LL, Woolf CJ, Gilliard N, Spahn DR, Decosterd I.** Upregulation of the voltage-gated sodium channel beta2 subunit in neuropathic pain models: characterization of expression in injured and non-injured primary sensory neurons. *J. Neurosci.* 25: 10970-10980, 2005.
219. **Pezet S, McMahon SB.** Neurotrophins: mediators and modulators of pain. *Annu. Rev. Neurosci.* 29: 507-538, 2006.
220. **Pietrangeli A, Leandri M, Terzoli E, Jandolo B, Garufi C.** Persistence of high-dose oxaliplatin-induced neuropathy at long-term follow-up. *Eur Neurol* 56: 13-16, 2006.
221. **Pinto LG, Jesse CR, Nogueira CW, Savegnago L.** Evidence for the involvement of glutamatergic and GABAergic systems and protein kinase A pathway in the antinociceptive effect caused by p-methoxy-diphenyl diselenide in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 88: 487-496, 2008.
222. **Planells-Cases R, Caprini M, Zhang J, Rockenstein EM, Rivera RR, Murre C, Masliah E, Montal M.** Neuronal death and perinatal lethality in voltage-gated sodium channel alpha(II)-deficient mice. *Biophys. J.* 78: 2878-2891, 2000.
223. **Porreca F, Lai J, Bian D, Wegert S, Ossipov MH, Eglen RM, Kassotakis L, Novakovic S, Rabert DK, Sangameswaran L, Hunter JC.** A comparison of the potential role of the tetrodotoxin-insensitive sodium channels, PN3/SNS and NaN/SNS2, in rat models of chronic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7640-7644, 1999.
224. **Price MP, McIlwrath SL, Xie J, Cheng C, Qiao J, Tarr DE, Sluka KA, Brennan TJ, Lewin GR, Welsh MJ.** The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. *Neuron* 32: 1071-1083, 2001.
225. **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.** 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: 9382-9387, 2005.
226. **Priestley JV, Michael GJ, Averill S, Liu M, Willmott N.** Regulation of nociceptive neurons by nerve growth factor and glial cell line derived neurotrophic factor. *Can J Physiol Pharmacol* 80: 495-505, 2002.
227. **Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz L, LaMantia A-S, McNamara JO, Williams SM.** *Neurosciences.* De Boeck, 2003.
228. **Ragsdale DS.** How do mutant Nav1.1 sodium channels cause epilepsy? *Brain Res Rev* 58: 149-159, 2008.
229. **Raouf R, Quick K, Wood JN.** Pain as a channelopathy. *J. Clin. Invest.* 120: 3745-3752, 2010.
230. **Raymond E, Chaney SG, Taamma A, Cvitkovic E.** Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies. *Ann Oncol* 9: 1053-1071, 1998.
231. **Reid G, Flonta M.** Cold transduction by inhibition of a background potassium conductance in rat primary sensory neurones. *Neurosci Lett* 297: 171-174, 2001.
232. **Renganathan M, Cummins TR, Waxman SG.** Contribution of Na(v)1.8 sodium channels to action potential electrogenesis in DRG neurons. *J Neurophysiol* 86: 629-640, 2001.
233. **Renn CL, Carozzi VA, Rhee P, Gallop D, Dorsey SG, Cavaletti G.** Multimodal assessment of painful peripheral neuropathy induced by chronic oxaliplatin-based chemotherapy in mice. *Mol Pain* 7: 29, 2011.
234. **Rexed B.** The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 96: 414-495, 1952.
235. **Rhinn H, Marchand-Leroux C, Croci N, Plotkine M, Scherman D, Escriou V.** Housekeeping while brain's storming Validation of normalizing factors for gene expression studies in a murine model of traumatic brain injury. *BMC Mol Biol* 9, 2008.
236. **Rothman SM, Huang Z, Lee KE, Weisshaar CL, Winkelstein BA.** Cytokine mRNA expression in painful radiculopathy. *J Pain* 10: 90-99, 2009.
237. **Rugiero F, Mistry M, Sage D, Black JA, Waxman SG, Crest M, Clerc N, Delmas P, Gola M.** Selective expression of a persistent tetrodotoxin-resistant Na⁺ current and Nav1.9 subunit in myenteric sensory neurons. *J Neurosci* 23: 2715-2725, 2003.

238. **Rush AM, Craner MJ, Kageyama T, Dib-Hajj SD, Waxman SG, Ranscht B.** Contactin regulates the current density and axonal expression of tetrodotoxin-resistant but not tetrodotoxin-sensitive sodium channels in DRG neurons. *Eur J Neurosci* 22: 39-49, 2005.
239. **Rush AM, Cummins TR, Waxman SG.** Multiple sodium channels and their roles in electrogenesis within dorsal root ganglion neurons. *J. Physiol. (Lond.)* 579: 1-14, 2007.
240. **Rush AM, Waxman SG.** PGE2 increases the tetrodotoxin-resistant Nav1.9 sodium current in mouse DRG neurons via G-proteins. *Brain Res* 1023: 264-271, 2004.
241. **Sakurai M, Egashira N, Kawashiri T, Yano T, Ikesue H, Oishi R.** Oxaliplatin-induced neuropathy in the rat: involvement of oxalate in cold hyperalgesia but not mechanical allodynia. *Pain* 147: 165-174, 2009.
242. **Sandoz G, Douguet D, Chatelain F, Lazdunski M, Lesage F.** Extracellular acidification exerts opposite actions on TREK1 and TREK2 potassium channels via a single conserved histidine residue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 14628-14633, 2009.
243. **Sangameswaran L, Delgado SG, Fish LM, Koch BD, Jakeman LB, Stewart GR, Sze P, Hunter JC, Eglén RM, Herman RC.** Structure and function of a novel voltage-gated, tetrodotoxin-resistant sodium channel specific to sensory neurons. *J Biol Chem* 271: 5953-5956, 1996.
244. **Sawada Y, Hosokawa H, Hori A, Matsumura K, Kobayashi S.** Cold sensitivity of recombinant TRPA1 channels. *Brain Res* 1160: 39-46, 2007.
245. **Saxena SK, George CM, Pinskiy V, McConnell B.** Epithelial sodium channel is regulated by SNAP-23/syntaxin 1A interplay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343: 1279-1285, 2006.
246. **Schepers RJ, Ringkamp M.** Thermoreceptors and thermosensitive afferents. *Neurosci Biobehav Rev* 34: 177-184, 2010.
247. **Schlieff T, Schönherr R, Imoto K, Heinemann SH.** Pore properties of rat brain II sodium channels mutated in the selectivity filter domain. *Eur. Biophys. J.* 25: 75-91, 1996.
248. **Schmelz M, Schmidt R, Bickel A, Handwerker HO, Torebjörk HE.** Specific C-receptors for itch in human skin. *J Neurosci* 17: 8003-8008, 1997.
249. **Schmelz M.** A neural pathway for itch. *Nat Neurosci* 4: 9-10, 2001.
250. **Schmidt M, Dubin AE, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A.** Nociceptive signals induce trafficking of TRPA1 to the plasma membrane. *Neuron* 64: 498-509, 2009.
251. **Schmidt R, Schmelz M, Forster C, Ringkamp M, Torebjörk E, Handwerker H.** Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci* 15: 333-341, 1995.
252. **Sherrington CS.** *The Integrative Action of the Nervous System.* Yale University Press, 1906.
253. **Shimizu H, Watanabe E, Hiyama TY, Nagakura A, Fujikawa A, Okado H, Yanagawa Y, Obata K, Noda M.** Glial Nax channels control lactate signaling to neurons for brain [Na⁺] sensing. *Neuron* 54: 59-72, 2007.
254. **Simone DA, Kajander KC.** Responses of cutaneous A-fiber nociceptors to noxious cold. *J Neurophysiol* 77: 2049-2060, 1997.
255. **Sleeper AA, Cummins TR, Dib-Hajj SD, Hormuzdiar W, Tyrrell L, Waxman SG, Black JA.** Changes in expression of two tetrodotoxin-resistant sodium channels and their currents in dorsal root ganglion neurons after sciatic nerve injury but not rhizotomy. *J Neurosci* 20: 7279-7289, 2000.
256. **Smith RD, Goldin AL.** Phosphorylation of brain sodium channels in the I-II linker modulates channel function in *Xenopus* oocytes. *J. Neurosci.* 16: 1965-1974, 1996.
257. **Smith RD, Goldin AL.** Functional analysis of the rat I sodium channel in *xenopus* oocytes. *J. Neurosci.* 18: 811-820, 1998.
258. **Snider WD, McMahon SB.** Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron* 20: 629-632, 1998.
259. **Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A.** ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112: 819-829, 2003.
260. **Strickland IT, Martindale JC, Woodhams PL, Reeve AJ, Chessell IP, McQueen DS.** Changes in the expression of Nav1.7, Nav1.8 and Nav1.9 in a distinct population of dorsal root ganglia innervating the rat knee joint in a model of chronic inflammatory joint pain. *Eur J Pain* 12: 564-572, 2008.
261. **Suzuki M, Mizuno A, Kodaira K, Imai M.** Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *J Biol Chem* 278: 22664-22668, 2003.
262. **Tanaka M, Cummins TR, Ishikawa K, Dib-Hajj SD, Black JA, Waxman SG.** SNS Na⁺ channel expression increases in dorsal root ganglion neurons in the carrageenan inflammatory pain model. *Neuroreport* 9: 967-972, 1998.

263. **Tate S, Benn S, Hick C, Trezise D, John V, Mannion RJ, Costigan M, Plumpton C, Grose D, Gladwell Z, Kendall G, Dale K, Bountra C, Woolf CJ.** Two sodium channels contribute to the TTX-R sodium current in primary sensory neurons. *Nat Neurosci* 1: 653-655, 1998.
264. **Tatsukawa T, Chimura T, Miyakawa H, Yamaguchi K.** Involvement of basal protein kinase C and extracellular signal-regulated kinase 1/2 activities in constitutive internalization of AMPA receptors in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* 26: 4820-4825, 2006.
265. **Tedesco E, Rigoni M, Caccin P, Grishin E, Rossetto O, Montecucco C.** Calcium overload in nerve terminals of cultured neurons intoxicated by alpha-latrotoxin and snake PLA2 neurotoxins. *Toxicon* 54: 138-144, 2009.
266. **Thut PD, Wrigley D, Gold MS.** Cold transduction in rat trigeminal ganglia neurons in vitro. *Neuroscience* 119: 1071-1083, 2003.
267. **Tillman DB, Treede RD, Meyer RA, Campbell JN.** Response of C fibre nociceptors in the anaesthetized monkey to heat stimuli: estimates of receptor depth and threshold. *J Physiol* 485 (Pt 3): 753-765, 1995.
268. **Toftagen C, McAllister RD, McMillan SC.** Peripheral neuropathy in patients with colorectal cancer receiving oxaliplatin. *Clin J Oncol Nurs* 15: 182-188, 2011.
269. **Tombola F, Pathak MM, Isacoff EY.** How Does Voltage Open an Ion Channel? *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22: 23-52, 2006.
270. **Treede RD, Meyer RA, Campbell JN.** Myelinated mechanically insensitive afferents from monkey hairy skin: heat-response properties. *J Neurophysiol* 80: 1082-1093, 1998.
271. **Uchida H, Ma L, Ueda H.** Epigenetic gene silencing underlies C-fiber dysfunctions in neuropathic pain. *J. Neurosci.* 30: 4806-4814, 2010.
272. **Vassilev PM, Scheuer T, Catterall WA.** Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science* 241: 1658-1661, 1988.
273. **Viana F, de la Peña E, Belmonte C.** Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression. *Nat Neurosci* 5: 254-260, 2002.
274. **Vijayaragavan K, Boutjdir M, Chahine M.** Modulation of Nav1.7 and Nav1.8 peripheral nerve sodium channels by protein kinase A and protein kinase C. *J Neurophysiol* 91: 1556-1569, 2004.
275. **Vriens J, Owsianik G, Hofmann T, Philipp SE, Stab J, Chen X, Benoit M, Xue F, Janssens A, Kerselaers S, Oberwinkler J, Vennekens R, Gudermann T, Nilius B, Voets T.** TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron* 70: 482-494, 2011.
276. **Wada A, Yanagita T, Yokoo H, Kobayashi H.** Regulation of cell surface expression of voltage-dependent Nav1.7 sodium channels: mRNA stability and posttranscriptional control in adrenal chromaffin cells. *Front Biosci* 9: 1954-1966, 2004.
277. **Waldmann R.** Proton-gated cation channels--neuronal acid sensors in the central and peripheral nervous system. *Adv. Exp. Med. Biol.* 502: 293-304, 2001.
278. **Waxman SG, Kocsis JD, Black JA.** Type III sodium channel mRNA is expressed in embryonic but not adult spinal sensory neurons, and is reexpressed following axotomy. *J Neurophysiol* 72: 466-470, 1994.
279. **West JW, Numann R, Murphy BJ, Scheuer T, Catterall WA.** A phosphorylation site in the Na⁺ channel required for modulation by protein kinase C. *Science* 254: 866-868, 1991.
280. **Windebank AJ, Grisold W.** Chemotherapy-induced neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 13: 27-46, 2008.
281. **Wirkner K, Sperlagh B, Illes P.** P2X3 receptor involvement in pain states. *Mol. Neurobiol.* 36: 165-183, 2007.
282. **Wolf S, Barton D, Kottschade L, Grothey A, Loprinzi C.** Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment strategies. *Eur J Cancer* 44: 1507-1515, 2008.
283. **Wood JN, Boorman JP, Okuse K, Baker MD.** Voltage-gated sodium channels and pain pathways. *J Neurobiol* 61: 55-71, 2004.
284. **Woodbury CJ, Zwick M, Wang S, Lawson JJ, Caterina MJ, Koltzenburg M, Albers KM, Koerber HR, Davis BM.** Nociceptors lacking TRPV1 and TRPV2 have normal heat responses. *J Neurosci* 24: 6410-6415, 2004.
285. **Wright SN, Wang SY, Kallen RG, Wang GK.** Differences in steady-state inactivation between Na channel isoforms affect local anesthetic binding affinity. *Biophys. J.* 73: 779-788, 1997.
286. **Xing H, Ling J, Chen M, Gu JG.** Chemical and cold sensitivity of two distinct populations of TRPM8-expressing somatosensory neurons. *J Neurophysiol* 95: 1221-1230, 2006.
287. **Xu H, Blair NT, Clapham DE.** Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. *J Neurosci* 25: 8924-8937, 2005.
288. **Yen Y-T, Tu P-H, Chen C-J, Lin Y-W, Hsieh S-T, Chen C-C.** Role of acid-sensing ion channel 3 in sub-acute-phase inflammation. *Mol Pain* 5, 2009.

289. **Yeomans DC, Levinson SR, Peters MC, Koszowski AG, Tzabazis AZ, Gilly WF, Wilson SP.** Decrease in inflammatory hyperalgesia by herpes vector-mediated knockdown of Nav1.7 sodium channels in primary afferents. *Hum Gene Ther* 16: 271-277, 2005.
290. **Yiangou Y, Birch R, Sangameswaran L, Eglon R, Anand P.** SNS/PN3 and SNS2/NaN sodium channel-like immunoreactivity in human adult and neonate injured sensory nerves. *FEBS Lett* 467: 249-252, 2000.
291. **Yousuf A, Klinger F, Schicker K, Boehm S.** Nucleotides control the excitability of sensory neurons via two P2Y receptors and a bifurcated signaling cascade. *Pain* 152: 1899-1908, 2011.
292. **Yu Y-Q, Zhao F, Guan S-M, Chen J.** Antisense-Mediated Knockdown of Na(V)1.8, but Not Na(V)1.9, Generates Inhibitory Effects on Complete Freund's Adjuvant-Induced Inflammatory Pain in Rat. *PLoS One* 6, 2011.
293. **Zhao B, Wang H-B, Lu Y-J, Hu J-W, Bao L, Zhang X.** Transport of receptors, receptor signaling complexes and ion channels via neuropeptide-secretory vesicles. *Cell Res*. 21: 741-753, 2011.
294. **Zhao P, Barr TP, Hou Q, Dib-Hajj SD, Black JA, Albrecht PJ, Petersen K, Eisenberg E, Wymer JP, Rice FL, Waxman SG.** Voltage-gated sodium channel expression in rat and human epidermal keratinocytes: evidence for a role in pain. *Pain* 139: 90-105, 2008.
295. **Zimmermann K, Leffler A, Babes A, Cendan CM, Carr RW, ichi Kobayashi J, Nau C, Wood JN, Reeh PW.** Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. *Nature* 447: 855-858, 2007.
296. **Zimmermann M.** Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16: 109-110, 1983.
297. **Zurborg S, Yurgionas B, Jira JA, Caspani O, Heppenstall PA.** Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺. *Nat Neurosci* 10: 277-279, 2007.
298. **Zwick M, Davis BM, Woodbury CJ, Burkett JN, Koerber HR, Simpson JF, Albers KM.** Glial cell line-derived neurotrophic factor is a survival factor for isolectin B4-positive, but not vanilloid receptor 1-positive, neurons in the mouse. *J Neurosci* 22: 4057-4065, 2002.

Stéphane LOLIGNIER - Rôle du canal sodique Nav1.9 dans la douleur inflammatoire, dans la perception du froid et dans l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine
Thèse de doctorat d'Université, soutenue le 16 décembre 2011 à l'Université d'Auvergne

Les canaux sodiques dépendants du voltage, ou canaux Nav, jouent un rôle capital dans l'excitabilité neuronale, dans la genèse et dans la propagation des potentiels d'action. Au sein de cette famille, le canal Nav1.9 se distingue par une expression restreinte aux nocicepteurs et par des propriétés électrophysiologiques uniques qui, si elles excluent sa contribution à la phase dépolarisante du potentiel d'action, lui confèreraient un rôle dans la modulation de l'excitabilité des nocicepteurs. Ce travail de thèse vise à caractériser son implication dans la physiopathologie de la douleur par une approche comportementale, moléculaire et fonctionnelle.

La première partie de ce travail consiste à étudier la contribution du canal Nav1.9 à la douleur inflammatoire. Nous avons donc réalisé différents tests comportementaux chez des souris knock-out (KO) et des rats traités par antisens (knock-down) modèles de douleur inflammatoire (aigu, subaigu, chronique). L'expression du canal ainsi que ses propriétés électrophysiologiques sont ensuite analysées chez ces mêmes modèles animaux. Notre premier constat est que le canal Nav1.9 n'est pas impliqué dans la réponse à une stimulation mécanique ou thermique chaude nociceptive chez des animaux sains. En revanche, l'hypersensibilité douloureuse thermique et mécanique induite par une inflammation subaiguë (carragénine intraplantaire) ou chronique (monoarthrite) est significativement réduite chez la souris KO Nav1.9. Un résultat similaire est obtenu par traitement antisens chez le rat, sur le modèle d'inflammation subaiguë. Chez la souris, suite à l'induction d'une inflammation subaiguë, une légère diminution suivie d'une forte augmentation de l'expression protéique du canal Nav1.9 est observée dans les ganglions rachidiens innervant la patte enflammée. Une augmentation de la quantité de canaux est également observée au niveau des troncs nerveux cutanés innervant cette même zone. Les canaux néosynthétisés ne contribuent pas au courant sodique enregistré en patch clamp dans les corps cellulaires des neurones des ganglions rachidiens, mais nos données suggèrent qu'ils sont exportés en direction des terminaisons nerveuses, où ils pourraient devenir fonctionnels et augmenter l'excitabilité cellulaire.

La deuxième partie de ce travail de thèse consiste à caractériser l'implication de canal Nav1.9 dans la perception du froid et dans l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine. Nous avons en effet observé de manière inattendue que les souris KO Nav1.9 présentent des seuils de douleur au froid (<10°C) plus élevés que les souris sauvages. Ce phénomène est confirmé par plusieurs tests comportementaux chez les souris KO et chez des rats traités par antisens anti-Nav1.9. L'oxaliplatine, prescrit dans le traitement des cancers colorectaux, est connu pour induire une hypersensibilité au froid invalidante chez la majorité des patients. Nous avons donc décidé d'étudier la contribution du canal Nav1.9 à ce symptôme. Suite à une injection unique d'oxaliplatine, une forte hypersensibilité au froid apparaît chez les souris dès 20°C. Nous montrons que le KO Nav1.9 permet de supprimer l'hypersensibilité au froid aux températures normalement non douloureuses (20 et 15°C, allodynie), et de réduire l'hypersensibilité aux températures douloureuses (10 et 5°C, hyperalgie). Le même effet est observé chez le rat après traitement antisens.

En conclusion, ce travail permet de mettre en évidence l'intérêt du canal Nav1.9 en tant que cible pharmacologique potentielle pour le traitement de douleurs inflammatoires et de l'hypersensibilité au froid induite par l'oxaliplatine. Il est de plus intéressant de constater que les seuils de réponse à des stimuli nociceptifs ne sont pas perturbés chez les souris KO Nav1.9 saines, à l'exception de la douleur provoquée par des températures froides extrêmes. Le blocage du canal Nav1.9 aurait donc des propriétés anti-hyperalgiques plutôt qu'antalgique, ce qui est conceptuellement intéressant.

Mots-clés : douleur, canaux ioniques, voltage-gated sodium channel, Nav1.9, SCN11A, nocicepteur, inflammation, neuropathie, froid, allodynie, hyperalgie, oxaliplatine, rat, souris

Jury : Dr Patrick DELMAS (Président du jury)
Pr Alain ESCHALIER (Directeur de thèse)
Dr Jérôme BUSSEROLLES (Co-directeur de thèse)
Dr Emmanuel BOURINET (Rapporteur)
Pr Rémy SCHLICHTER (Rapporteur)

Adresse de l'auteur : UMR 766 INSERM/UdA "Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur"
Faculté de Médecine/Pharmacie, 28 place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand